

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Développement d'un modèle murin d'infection cutanée par *Brucella melitensis*

Lison, Aurore

*Award date:*  
2015

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**Développement d'un modèle murin d'infection cutanée  
par *Brucella melitensis***

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Aurore LISON

Janvier 2015

**Université de Namur**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

## **Développement d'un modèle murin d'infection cutanée par *Brucella melitensis***

LISON Aurore

*Brucella* spp. est une bactérie gram-négative intracellulaire facultative qui infecte les mammifères de façon chronique causant la brucellose, l'une des zoonoses les plus fréquentes au monde. Le modèle de référence pour l'étude de la brucellose est l'injection intrapéritonéale de la bactérie chez la souris. Hors, l'essentiel des infections naturelles s'effectue via les voies de transmission orales, aérosols ou contact direct avec la peau abrasée. Dans certains groupes occupationnels tels que les éleveurs de bétail, les bouchers ou les vétérinaires, une lésion cutanée en contact direct avec un animal ou des tissus infectés (avortons, placenta ou liquide amniotique contaminé) peut également induire la maladie. Basé sur ces observations, nous avons développé un modèle d'infection plus physiologique par voie cutanée chez les souris C57BL/6. Ces dernières sont infectées au niveau du coussinet plantaire. Le développement de la lésion cutanée, la dissémination de *Brucella* jusqu'au ganglion poplité et à la rate ainsi que la réponse immunitaire induite sont étudiés. Dans ce modèle, nous avons tenté de déterminer le type cellulaire infecté par *Brucella*, analysé le phénotype des cellules recrutées dans la lésion et déterminé leur rôle dans le contrôle de l'infection. Les principales cellules recrutées dans la patte des souris C57BL/6 WT sont les monocytes. Les souris génétiquement déficientes pour le recrutement et l'activation de ces monocytes (souris IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> et CCR2<sup>-/-</sup>) développent des lésions importantes, causées par un recrutement excessif de neutrophiles. Ces résultats suggèrent également un rôle clé pour l'IFN- $\gamma$  dans l'activation des monocytes. Suite à cela, nous avons étudié la production d'IFN- $\gamma$  et phénotypé les cellules productrices dans les ganglions lymphatiques. Les Natural Killer (NK) et les lymphocytes TCD4 sont les principaux producteurs d'IFN- $\gamma$  dans les ganglions lymphatiques.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire  
Janvier 2015

**Promoteur:** Jean-Jacques Letesson

**Co-promoteur:** Eric Muraille



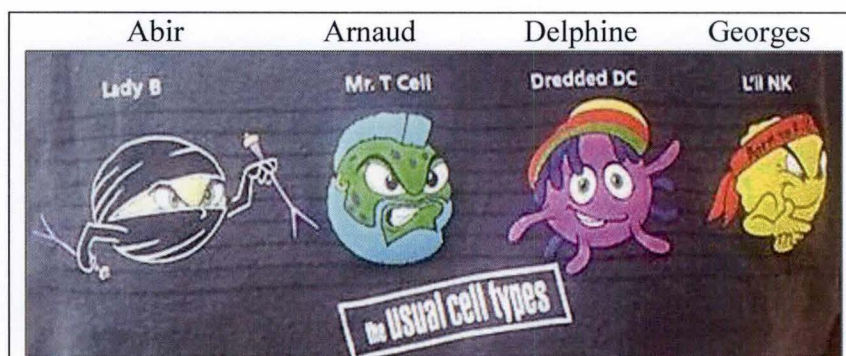
## Remerciements

Le mémoire, ce sont nos premiers pas en laboratoire, de nouvelles découvertes, beaucoup de travail, les premières « catastrophes » et un mélange intense d'émotions. C'est l'accomplissement de 5 années d'études, mais c'est avant tout de belles rencontres.

Mes premiers remerciements vont à mon promoteur, le Pr. Jean-Jacques Letesson, et mon co-promoteur, le Dr. Eric Muraille, pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire au sein du laboratoire. Merci du temps et de l'investissement que vous m'avez consacré. Ainsi que vos nombreux conseils, discussions et interprétations sans oublier les corrections apportées au cours de la rédaction de ce mémoire.

Aux membres du jury: M<sup>me</sup> Raes, M<sup>r</sup> Nicaise, M<sup>r</sup> Piret et M<sup>lle</sup> Lawarée. Merci du temps et de l'attention que vous portez à la lecture ce mémoire.

A toute l'équipe de l'URBM, un grand merci de votre accueil : Arnaud, Delphine, Abir, Georges, Mathilde, Emeline, Simon, Kevin, Thib, Lionel, Nayla, J-F, Phuong, Dunia, Jérôme, Séverin, Christian, Françoise, Mathieu, Etienne et tous les autres ! Merci à tous ceux que j'ai côtoyé au BL3. J'ai adoré y travailler, même si j'y ai aussi connu des moments de stress. Et merci plus particulièrement à la Team Immuno pour m'avoir acceptée dans votre élite de choc :



Arnaud : La reconnaissance éternelle? Faut pas abuser, non plus ;) En tout cas, merci pour ta patience et ta gentillesse. Et plus spécialement pour ton aide et ton soutien quand j'ai douté de moi ou quand j'ai pété des câbles avec les souris. Ton aide a été précieuse dans ces moments-là. Tu es un tuteur d'enfer ! Et même si tu refuses que je t'appelle comme ça, pour moi, tu resteras toujours le Capitaine. Et merci pour tous tes « -1 » !

Georgy, Darkside, Natural Killer ! Voilà tout est dit ! Entre nos presque-disputes, nos coups tordus, nos fous-rires et nos « c'est-moi-qui-monte-devant-dans-la-voiture ! », on aura quand même bien rigolé !

Simon, je voulais aussi te remercier plus particulièrement pour tous les moments où on faisait équipe contre le Capitaine, ainsi que de m'avoir trouvé le super surnom « biohazard » au BL3, c'est sûrement un des meilleurs souvenirs que je garderais de ce mémoire.



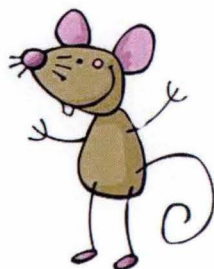
A tous les Master 2 - BBMC, merci pour ces belles années passées ensemble ! Lucie, Caroline, Damien, Dimitri, Gabrielle, Delphine, Nadège, Maxime, Olivier, Claire, Céline W., Céline E., Aurélie, Pierre P., Pierre S., Georges et Mathilde.

A ma famille, merci pour tout ce que vous m'avez appris et transmis. Mamatje, je ne serais pas arrivé aussi loin sans toi ! Merci pour ton amour inconditionnel et tes encouragements jour après jour. Maïté, ma zusje, tu es merveilleuse ! Tu m'éblouies chaque jour, je suis fière de toi ! A vous deux, vous êtes ce que j'ai de plus précieux ! Papa, continue de veiller sur nous depuis là-haut. Tu nous manques. Mon Alex, à mes côtés au quotidien ! Que ferais-je sans toi ? Plein de choses, me diras-tu. Mais je n'en ferais rien si tu n'es pas là pour les partager avec moi. Merci pour tout !

En tout dernier lieu, je pense à toutes les petites souris qui m'ont permis de réaliser ce travail.

De manière générale, un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement et à la réalisation de ce mémoire.

En vous souhaitant une agréable lecture,



## Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
CCL2	Chemokine ligand 2
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CD 3/4/8	Cluster de différenciation 3/4/8
CFU	Colony forming units
CLR	C-type lectin receptor
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DC	Cellules dendritiques
IC	Infection cutanée
IFN- $\gamma$	Interféron-gamma
IFN- $\gamma$ R	Récepteur à l'interféron-gamma
IL	Interleukine
IP	Intrapéritonéal
IN	Intranasal
iNOS	Inductible nitric oxyde synthase
ILC	Celles lymphoïdes innées
LC	Cellules de Langerhans
LPS	Lipopolysaccharides
LT $\beta$	Lymphotoxine- $\beta$
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NETs	Neutrophils extracellular trap
NK	Natural killer
NKT	Natural killers T cell
NO	Oxyde nitrique
NLR	Récepteur de type NOD (nucleotide oligomerization domain)
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
pH	Potentiel hydrogène
PMN	Polymorphonucléaire
PRR	Patter recognition receptor
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Réactifs dérivés de l'oxygène
RNS	Réactifs dérivés de l'azote
SC	Sous-cutané
SOPF	Specific and Opportunistic Pathogen Free
SPF	Specific Pathogen Free
TAP	Transporter associated with antigen processing
TCR	T-cell receptor
T <sub>H</sub>	T helper
TLR	Tool-like receptor
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
T4SS	Système de sécrétion de type 4
WT	Wild-type (type sauvage)

## Table des matières

Introduction .....	10
1. <i>Brucella</i> .....	10
1.1 Le genre <i>Brucella</i> .....	10
1.2 Brucellose : une zoonose planétaire .....	11
1.3 Manifestations cutanées induites par <i>Brucella</i> .....	12
1.4 Trafic intracellulaire de <i>Brucella</i> et mécanismes de virulence.....	12
2. Le système immunitaire .....	13
2.1 Les généralités .....	13
2.2 Le système immunitaire inné.....	13
Les barrières passives de l'organisme .....	13
Détection des pathogènes et activation de l'immunité innée.....	14
Mécanismes de défense de l'immunité innée .....	14
Principales cellules de l'immunité innée .....	15
2.3 Transition entre l'inné et l'adaptatif.....	17
Les organes lymphoïdes .....	17
Les cellules dendritiques : cellules présentatrices d'antigènes professionnelles.....	17
2.4 L'immunité adaptative .....	18
Les lymphocytes : cellules de l'immunité adaptative.....	18
Différenciation des lymphocytes TCD4/ TCD8 .....	19
Différents « subsets » de T helper .....	20
Les lymphocytes non-conventionnels.....	20
3. La peau et son rôle dans l'immunité.....	21
4. Réponses immunitaires contre <i>Brucella</i> .....	22
4.1 Le modèle d'étude <i>in vivo</i> : <i>Mus musculus</i> .....	22
4.2 Le modèle intrapéritonéal.....	22
4.3 Le modèle intranasal .....	24
5. Notre modèle d'infection cutanée .....	24
Résultats .....	27
1. Suivi de l'infection par <i>Brucella melitensis</i> chez les souris C57BL/6 sauvage et déficientes ..	27
2. Analyse des cellules productrices d'IFN- $\gamma$ dans les ganglions lymphatiques .....	30
3. Etudes préliminaires .....	35
3.1 Le rôle de l'iNOS <sup>-/-</sup> dans le contrôle de l'infection.....	35
3.2 Influence du ganglion drainant dans le contrôle de l'infection cutanée .....	35
3.3 Implication des lymphocytes B dans le contrôle de l'infection.....	35



Discussion .....	37
1. Comparaison des différents modèles d'infection par <i>Brucella melitensis</i> chez la souris .....	37
Identification des cellules infectées par <i>Brucella</i> dans le modèle cutané .....	37
Caractérisation de la réponse immunitaire contre <i>Brucella</i> dans le modèle cutané.....	38
L'IFN- $\gamma$ ne serait pas le seul facteur requis pour assurer le contrôle de l'infection cutanée par <i>Brucella</i> .....	40
2. Comparaison avec le modèle d'infection <i>Leishmania</i> .....	41
Conclusions .....	43
Perspectives .....	44
Matériel .....	46
1. Souche bactérienne.....	46
2. Souris.....	46
3. Milieux .....	46
Milieu de culture riche pour <i>Brucella</i> : Le 2 YT agar .....	46
PBS 10x .....	46
FACS Buffer .....	46
Milieu de culture complet pour cellules eucaryotes .....	47
PBS-triton pour lyser les cellules .....	47
Solution de blocking.....	47
Paraformaldéhyde (PFA) (4%) .....	47
Collagénase D.....	47
Dnase I.....	48
Origines des réactifs .....	48
Méthodes .....	49
1. Réveil de la souche bactérienne .....	49
2. Mise en culture liquide .....	49
3. Préparation de la dose infectante .....	49
4. Infection des souris.....	49
5. Euthanasie et dissection des souris.....	50
6. Evaluation du titre bactérien dans les organes prélevés .....	50
7. Cytométrie de flux.....	51
8. Microscopie à fluorescence .....	53
9. Taille des lésions et aspect .....	54
10. Analyse statistique.....	54
Annexe .....	55
Bibliographie.....	58

*"No matter how many mistakes you make or how slow you progress, you are still way ahead of everyone who isn't trying."*

*Anthony Robbins*

## **Introduction**

---



# Introduction

## 1. Brucella

### 1.1 Le genre *Brucella*

*Brucella* spp. est un coccobacille gram-négatif de la classe des alpha-protéobactéries. Cette bactérie est intracellulaire facultative aérobie stricte. Il s'agit de l'agent de la brucellose, une anthroponose<sup>1</sup> très répandue à travers le monde. La maladie est connue depuis longtemps, on en retrouve les premières traces dans l'Égypte des pharaons (Neubauer, 2010). La bactérie a été isolée pour la première fois en 1887 par David Bruce à Malte à partir de la rate d'un soldat décédé (Galinska E.M., Zagorski J.,2013).

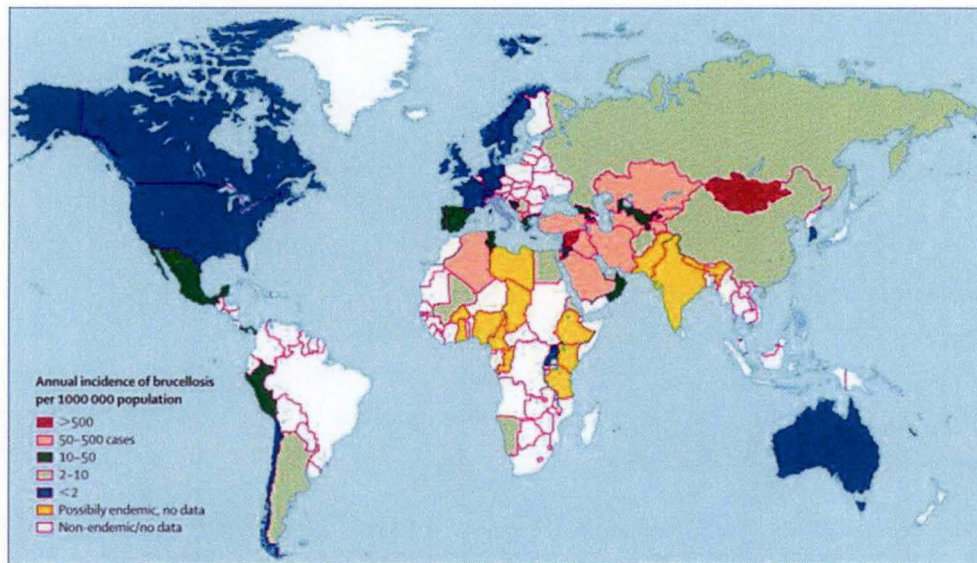
Aujourd'hui, le genre *Brucella* est composé de plusieurs espèces, chacune présentant un ensemble d'hôtes spécifiques (tableau 1). Par exemple, *Brucella melitensis* dont les hôtes naturels sont les chèvres et les moutons ; *Brucella abortus* que l'on retrouve chez les bovins ; *Brucella suis* qui infecte principalement les suidés et *Brucella canis* qui a été isolé à partir de chiens. Ces quatre espèces sont décrites comme pathogènes pour l'homme. Néanmoins, l'infection des hommes par *Brucella canis* est peu documentée (Yongqun He.,2012). La souche la plus infectieuse chez l'homme est *Brucella melitensis*.

Espèces	Hôtes spécifiques
<i>Brucella melitensis</i>	chèvres et moutons
<i>Brucella abortus</i>	bovins
<i>Brucella suis</i>	suidés
<i>Brucella canis</i>	chiens
<i>Brucella ovis</i>	ovidés
<i>Brucella neotomae</i>	rats et souris
<i>Brucella ceti</i>	mammifères marins (cétacés)
<i>Brucella pinnipedialis</i>	mammifères marins (phoques)
<i>Brucella microti</i>	campagnols communs et renards roux

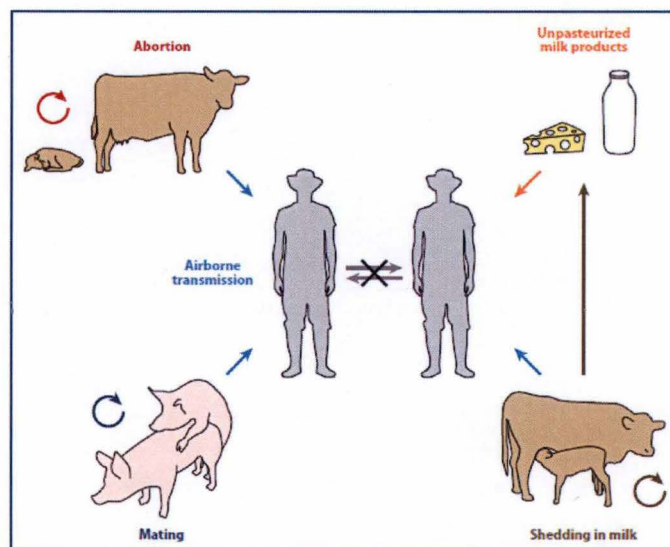
Tableau 1 - Les différentes espèces de *Brucella* et leur spécificité d'hôte.

D'autres membres du genre *Brucella* sont encore peu caractérisés. Par exemple, *Brucella inopinata* a été isolée à partir d'une blessure dans un implant mammaire chez une femme présentant des signes cliniques de brucellose. Son hôte naturel est encore inconnu. (O'Callaghan, Whatmore,2011 ; Galinska E.M., Zagorski J.,2013 ; Gorbelt M., 1997) Plus récemment, de nouveaux membres potentiels du genre *Brucella* ont été découverts. En 2012, des isolats bactériens prélevés chez une grenouille ont montré jusqu'à 90% de similarité avec *Brucella inopinata* (Eisenberg et al., 2012). En 2014, une autre étude réfère la découverte de *Brucella papionis* chez le babouin (*Papio spp.*) (Whatmore et al.,2014).

<sup>1</sup> Une anthroponose est une maladie transmissible de l'animal à l'homme et inversement dans des conditions naturelles.



**Figure 1 – Répartition de la brucellose dans le monde.** La brucellose est une zoonose largement répandue dans le monde. Son incidence est plus importante dans les régions méditerranéennes, d'Amérique centrale et latine, en Asie et en Afrique (*Pappas et al., 2006*)



**Figure 2 – Transmission de Brucella.** Selon les espèces de *Brucella*, la transmission entre animaux se fait lors de l'avortement, de la reproduction ou lors de l'ingestion de lait contaminé. La transmission à l'homme se fait principalement par aérosols ou voie alimentaire (*Atluri et al, 2011*).



## 1.2 Brucellose : une zoonose planétaire

La brucellose est l'une des plus importantes zoonoses au monde. Chaque année, plus de 500.000 nouveaux cas humains sont déclarés (*Atluri et al., 2011; Godfroid et al., 2005*). Sa prévalence est plus grande dans les pays n'ayant pas de standards adéquats en matière de santé publique ou de protection des animaux (figure 1). Les régions les plus à risques sont les régions du bassin méditerranéen, mais aussi les pays d'Amérique Centrale et d'Amérique du Sud, l'Asie et l'Afrique (*Galinska, Zagorski, 2013 ; Pappas et al, 2006*).

Chez leurs hôtes naturels, les *Brucella* colonisent le système reproducteur, les glandes mammaires et l'épididyme induisant l'avortement des femelles infectées et la stérilité des mâles (*Atluri et al, 2011; Pappas et al., 2006; Martirosyan et al, 2011*). Une épidémie de brucellose peut engendrer des conséquences dramatiques en matière d'économie. En effet, quand un animal est infecté, il est recommandé d'abattre l'élevage complet<sup>2</sup> (*Blasco JM, 2010*).

La transmission chez les animaux se fait principalement par aérosols (lors de l'avortement des femelles infectées) et plus rarement par voie alimentaire suite à l'ingestion d'aliments contaminés tels que le lait ou lors de la reproduction (figure 2). L'homme est un hôte accidentel de *Brucella* (*Atluri et al., 2011*).

*Brucella* peut survivre et se répliquer dans la majorité des systèmes et des organes. La maladie peut mimer un large panel de syndromes, ce qui la rend difficile à diagnostiquer (*Galinska E.M., Zagorski J., 2013*). Actuellement, chez l'homme, seuls des tests sérologiques (détection d'anticorps anti-*Brucella*) permettent de diagnostiquer la maladie.




La brucellose est souvent asymptomatique chez l'homme. Dans le cas contraire, les signes cliniques sont relativement variés allant de l'état grippal général à des complications sévères au niveau du système nerveux, du système musculo-squelettal ou du cœur. Le symptôme principal de la maladie chez l'homme est une fièvre ondulante caractéristique de la phase aigüe (fièvre de Malte). Si la maladie n'est pas traitée rapidement par la prise d'antibiotiques<sup>3</sup>, elle devient chronique avec de nombreux points d'inflammation entraînant des douleurs articulaires et musculaires, des problèmes cardiaques, des troubles psycho-neurologiques, une splénomégalie/hépatomégalie et des lésions cutanées variées (*Karaali et al., 2010 ; Atluri et al., 2011*).

---

<sup>2</sup> Dans les régions développées et en fonction des possibilités économiques, les autorités recommandent le remboursement des pertes liées à l'abattage du bétail infecté par *Brucella* afin de limiter les coups socio-économiques pour les éleveurs (*Blasco JM, 2010*).

<sup>3</sup> Comme *Brucella* est une bactérie intracellulaire, il faut utiliser des antibiotiques actifs contre la bactérie mais aussi pénétrant dans les cellules. L'OMS recommande la prise de rifampicine (600 mg/jour) et de doxycycline (200 mg/jour) durant 6 semaines.



Ecchymoses	Erythème de type maculopapulaire	Panniculite
		

**Tableau 2 – Lésions cutanées associées à la brucellose.** Les lésions cutanées associées à la brucellose sont non-spécifiques de la maladie. Elles imitent une large gamme de pathologies dermatologiques (*Ersa Tanyel et al., 2008; Akcali et al., 2007; Kaarali et al., 2010; Ayse Albayrak et al., 2012; Milions et al., 2000*).

### 1.3 Manifestations cutanées induites par *Brucella*

De nombreux cas cliniques de manifestations cutanées ont été rapportés. Ces lésions se produisent dans 15% des cas humains. Les manifestations cutanées de *Brucella* sont non-spécifiques et semblables aux lésions observées dans de nombreuses autres pathologies dermatologiques (Karaali et al., 2010). Les lésions les plus fréquemment rencontrées sont les éruptions cutanées, l'eczéma, le purpura (lésion hémorragique de la peau), les ulcères, les abcès, les érythèmes noueux, les ecchymoses et les vascularites (tableau 2). La panniculite, c'est-à-dire l'inflammation de la couche adipeuse sous-cutanée est une manifestation plus rare (Ersa Tanyel et al., 2008; Akcali et al., 2007 ; Kaarali et al., 2010 ; Ayse Albayrak et al., 2012 ; Milions et al., 2000).

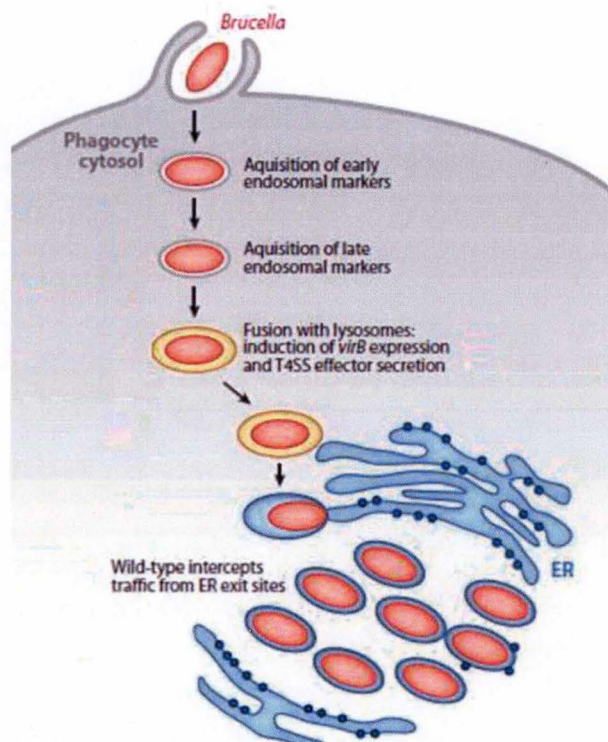
Ces symptômes cutanés sont le résultat soit d'inoculation directe de *Brucella* sur une peau endommagée, soit de phénomène d'hypersensibilité tels que les dépôts de complexes immuns. Certains groupes professionnels tels que les éleveurs de bétail, le personnel d'abattoir ou les vétérinaires sont des groupes occupationnels à risque. En effet, ceux-ci sont plus souvent en contact avec des animaux infectés. Si la peau des mains est endommagée pendant un contact direct avec le placenta infecté, un avorton ou le liquide amniotique lors de procédures gynécologiques ou le dépouillement d'animaux abattus, cette brèche dans la peau peut être une voie d'entrée facile pour la bactérie (Galinska E.M., Zagorski J., 2013).

Quand la voie de transmission est intradermale, comme dans le cas d'une invasion directe par une lésion cutanée, *Brucella* atteint le système lymphatique pour se rendre dans les ganglions régionaux. A partir de là, si les bactéries ne sont pas arrêtées, elles entrent dans la circulation sanguine et atteignent la rate ainsi que la majorité des systèmes et des organes (Kaarali et al., 2010).

### 1.4 Trafic intracellulaire de *Brucella* et mécanismes de virulence

*Brucella* est une bactérie intracellulaire facultative. *In vitro*, elle infecte les cellules phagocytaires et non-phagocytaires (Ko et Splitter, 2003; Kohler et al., 2003; Roop et al., 2004). *In vivo*, les principales cibles sont les cellules phagocytaires tels que les macrophages et les cellules dendritiques (Copin et al., 2007 ; Gorbil et al., 1997).

Lors de l'infection des cellules phagocytaires, *Brucella* est rapidement internalisée. Un processus de dégradation des bactéries est alors mis en place par ces cellules. La vacuole intracellulaire, dans laquelle la bactérie se trouve, va mûrir et fusionner avec des endosomes précoces puis tardifs pour former le phagosome. Celui-ci va s'acidifier jusqu'à un pH de 4 - 4,5 (Atluri et al. 2011). Ensuite, le phagosome va fusionner avec les lysosomes pour former le phagolysosome. Les lysosomes libèrent des enzymes digestives telles que les hydrolases acides qui vont digérer les bactéries (Desjardins M, 2003). Cependant, *Brucella* va dévier le trafic intra-endocytaire de la cellule hôte pour échapper à sa dégradation. La virulence de *Brucella* est liée à sa capacité à survivre et à se répliquer au sein des cellules phagocytaires.



**Figure 3 - Trafic intracellulaire de *Brucella* dans un macrophage.** La bactérie échappe à la dégradation grâce à la transcription des effecteurs encodés par son opéron *virB* et grâce à sa fusion avec le réticulum endoplasmique (RE) (modifié à partir d'Atluri *et al.* 2011)



Lorsque le pH de la vacuole s'acidifie, l'opéron *virB* de *Brucella* est exprimé. Celui-ci code pour un système de sécrétion de type IV (T4SS) et différents effecteurs. La vacuole va finalement fusionner avec le réticulum endoplasmique (RE), qui lui fournit les nutriments nécessaires (figure 3). De plus, l'acquisition des marqueurs du RE à la surface de sa vacuole permet à la bactérie d'échapper aux lysosomes (Atluri et al. 2011). Les éléments encodés par l'opéron *virB* sont donc essentiels à la survie et à la réplication de *Brucella* dans la cellule-hôte (DelVecchio et al., 2002 ; Paulsen et al., 2002 ; Xiang et al., 2006).

## **2. Le système immunitaire**

### **2.1 Les généralités**

Le système immunitaire est le système de protection de chaque individu. Ce système est complexe et composé de nombreux éléments solubles et cellulaires. L'immunité est impliquée dans la reconnaissance des corps étrangers, la réponse de défense mais aussi la prévention de futures attaques. Il doit être capable de discriminer les éléments du « soi » et du « non-soi » ainsi que le risque de danger afin de maintenir l'intégrité de l'organisme.

Le système immunitaire est constitué de deux grandes parties. La première est l'immunité innée qui comprend les barrières physiologiques du corps, les premières lignes de défense cellulaires ainsi que différents mécanismes d'actions rapides. C'est une réponse peu spécialisée. La deuxième est l'immunité adaptative qui est plus tardive mais spécifique à chaque type de pathogènes. Les deux systèmes coopèrent afin de générer une réponse efficace. De plus, grâce à l'immunité adaptative, l'hôte peut développer une mémoire immunitaire de longue durée capable de produire une réponse plus rapide et efficace lors de nouvelles attaques du pathogène.

### **2.2 Le système immunitaire inné**

#### **Les barrières passives de l'organisme**

Les premières barrières rencontrées par le pathogène sont physiologiques. La peau est la toute première barrière physique de l'organisme. Les muqueuses, le pH acide de certains organes tel que l'estomac et la flore bactérienne intestinale sont également des barrières naturelles (Nestle et al., 2009). Lorsque ces barrières sont neutralisées, les pathogènes ont libre accès à l'organisme. C'est le cas dans une lésion de la peau pour notre modèle d'infection intradermale par *Brucella*.

## Détection des pathogènes et activation de l'immunité innée

Une fois à l'intérieur de l'organisme, les pathogènes sont détectés par des récepteurs : les « pattern recognition receptors » (PRRs). Il s'agit d'une grande famille de récepteurs parmi lesquels on retrouve les TLRs (Toll-like receptors), les CLR (C-Type Lectin Receptors) et les NLR (récepteurs de type NOD). Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes : les PAMPs (pathogen-associated molecular pattern). Ces motifs correspondent à des caractéristiques propres aux microorganismes (pathogènes ou non). On y retrouve les lipopolysaccharides (reconnus par le TLR4), les lipoprotéines (reconnues par le TLR2), la flagelline (reconnue par le TLR5), l'ADN exogène (reconnu par le TLR9) ou encore l'ARN viral (reconnu par le TLR3). Les PRRs détectent aussi les dommages moléculaires engendrés par la présence du pathogène, ce sont les DAMPs (damage-associated molecular pattern molecules). La reconnaissance de PAMPs ou DAMPs par les PRRs entraîne l'activation de voies de signalisation, afin d'induire les mécanismes de défense de l'immunité innée et adaptative. Dans le cas de *Brucella*, les TLR 2, 4 et 9 sont impliqués dans la détection de la bactérie (Copin et al., 2007). Ils reconnaissent respectivement les lipoprotéines, les lipopolysaccharides et l'ADN de la bactérie (Weiss et al. 2005).

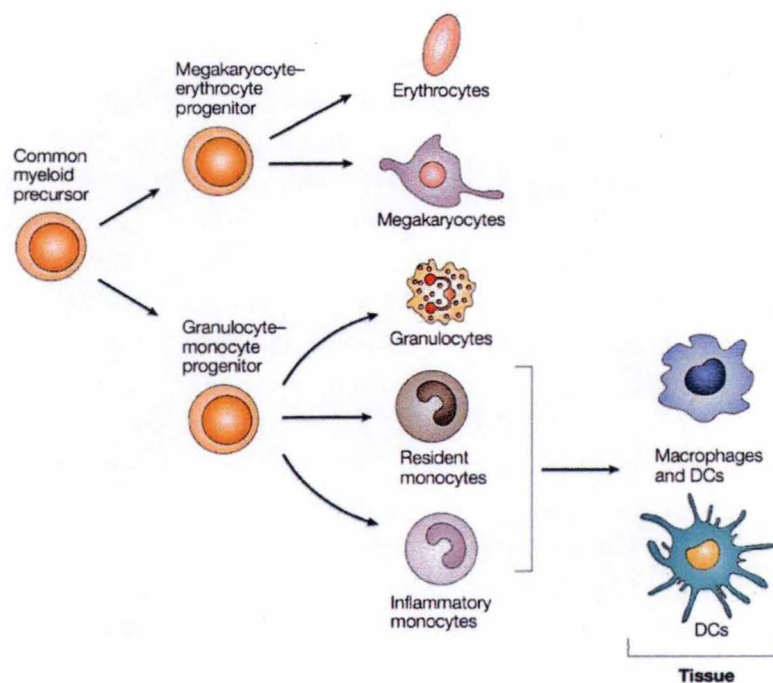
## Mécanismes de défense de l'immunité innée

Les premiers mécanismes de défense mis en place sont très aspécifiques. Parmi ceux-ci, on retrouve la phagocytose, la libération de réactifs dérivés de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS). Ces mécanismes servent non seulement à éliminer les pathogènes mais aussi à limiter leur dissémination dans l'organisme.

La phagocytose est un mécanisme d'internalisation des pathogènes dépendant du cytosquelette des cellules phagocytaires, aussi appelé phagocytes. Les principaux phagocytes sont les macrophages, les cellules dendritiques et les polymorphonucléaires (PMNs) (Djalal et al., 2002). Le processus de phagocytose se déroule en 3 grandes étapes. La première est la reconnaissance et l'adhésion des pathogènes aux phagocytes. La deuxième étape est l'internalisation du pathogène par endocytose. La membrane plasmique des phagocytes va se déformer en bras appelés pseudopodes et entourer le pathogène en créant une vacuole intracellulaire. Celle-ci mature, s'acidifie et fusionne avec des lysosomes qui ont pour but d'éliminer l'agent étranger. Les débris de l'agent pathogène sont ensuite rejetés.

Les dérivés actifs (RNS et/ou ROS) produits par l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la NADPH oxydase sont essentiels à l'élimination des pathogènes. Le NO ainsi que les autres radicaux produits s'attaquent aux éléments de la structure des pathogènes tels que les lipides ou les groupes thiols. Il a été démontré que les souris déficientes pour l'iNOS sont plus susceptibles aux infections, comme *Listeria monocytogenes* ou *Leishmania* spp. (Nathan et Shiloh, 2000). C'est également le cas dans l'infection par *Brucella* (Copin et al, 2007).





**Figure 4 - Progéniteurs myéloïdes et les cellules différenciées.** Parmi les polynucléaires granulocytes, on retrouve les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les monocytes circulants peuvent se différencier en macrophages ou cellules dendritiques (adapté d'*Imhof et al, 2004*).



## Principales cellules de l'immunité innée

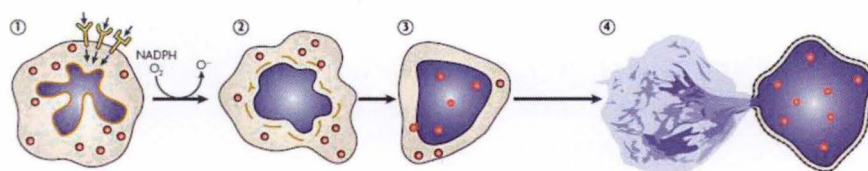
Différents types cellulaires sont capables de remplir les fonctions décrites précédemment. Ici, seuls les macrophages, les neutrophiles et les Natural killers (NK) seront définis.

Les macrophages sont les phagocytes tissulaires les plus connus. Ils possèdent des propriétés de phagocytose et de nettoyage des débris cellulaires ou des corps étrangers. Cependant, les macrophages sont impliqués dans de nombreux autres mécanismes. Les macrophages peuvent se différencier selon plusieurs configurations incluant M1 et M2. Les macrophages M1 sont associés à une augmentation de l'activité microbicide contre les pathogènes intracellulaires alors que les macrophages M2 possèdent des propriétés anti-inflammatoires grâce l'expression d'interleukine (IL)-10. Ils contribuent aussi à l'homéostasie de la peau et à la réparation des blessures (*Malissen et al., 2014*).

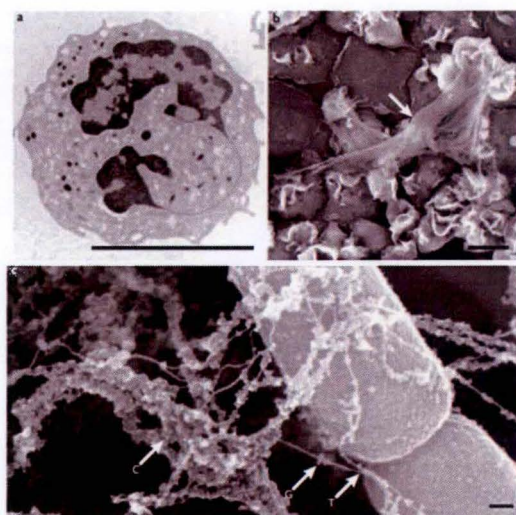
Les macrophages participent à l'immunité innée en tant que défense non-spécifique, mais sont aussi capables de participer à l'immunité adaptative via le phénomène d'opsonisation et de présentation d'antigènes. Les antigènes sont des motifs peptidiques dérivées d'un pathogène qui permettent l'activation des cellules de l'immunité adaptative lors que les antigènes leurs sont présentes (voir point 2.3). De plus, les macrophages entrent aussi dans la formation des granulomes pour contenir les pathogènes résistants à l'immunité (*Bolt et Ernst, 200 ; Copin et al., 2012*).

Les macrophages peuvent se différencier à partir des monocytes. Les monocytes se trouvent dans la circulation sanguine. Lors de la détection d'un pathogène, ils extravasent rapidement vers le site d'inflammation en suivant le gradient de chémokines. Une population de ces monocytes est positive pour CCR2 (C-C chemokine receptor type 2). CCR2 est un récepteur en surface des monocytes qui reconnaît un ligand CCL2, impliqué dans l'infiltration des monocytes de la moelle osseuse vers le sang.

On a longtemps pensé que les macrophages dériveraient uniquement de la différenciation des monocytes (figure 4). Aujourd'hui, d'autres observations suggèrent l'existence d'un pool de macrophages prénatal qui serait complètement indépendant de l'hématopoïèse. Chez les souris en condition SOPF (*specific-and-opportunistic-pathogen-free-conditions*), les macrophages de la peau pourraient être un mélange entre le pool prénatal et le pool dérivé des monocytes (*Malissen et al., 2014*). La contribution des monocytes permettrait ainsi au fil du temps de garantir un pool de macrophages suffisants après les attaques pathogènes et les inflammations répétées.

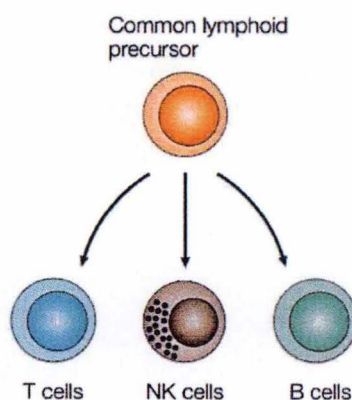


**Figure 5 – Formation des Neutrophils extracellular traps (NETs).** L'activation des neutrophiles entraîne la production de ROS. Ceux-ci induisent la désintégration des membranes nucléaires. La chromatine libérée dans le cytosol se mélange aux granules. Le tout sera expulsé sous forme de filet lors de la contraction de la cellule. (Brinkmann, V., Zychlinsky A., 2007).



**Figure 6 – Images en microscopie des neutrophiles et de leurs NETs.** Les barres d'échelle représentent 5 pm pour a, 10 um pour b, 100 nm pour c (Brinkmann, V., Zychlinsky A., 2007)

a) micrographie électronique à transmission d'un neutrophile non-stimulé.  
 b) micrographie électronique à balayage de neutrophile stimulé formant des NET.  
 c) une vue détaillée de NET entourant *Shigella*. T indique les «fils», G indique les domaines globulaires et C les câbles.



**Figure 7 – Différenciation des précurseurs lymphoïdes.** Ceux-ci peuvent se différencier en lymphocytes T et B ou en Natural killers (NK). Ces derniers, contrairement aux lymphocytes, ne nécessitent aucune activation préalable et sont donc classés dans les cellules de l'immunité innée (adapté d'Imhof et al, 2004)



Les neutrophiles sont des cellules myéloïdes polynucléaires granulocytes (figure 4). Ce sont les premiers leucocytes recrutés au site d'infection. Ils ont de nombreuses fonctions (*Kolaczowska et al., 2013 ; Nathan, 2006*). Tout d'abord, ce sont des phagocytes : ils internalisent et détruisent des débris cellulaires ainsi que des agents étrangers. Ensuite, ils possèdent des propriétés cytotoxiques pour détruire les cellules infectées. Ce mécanisme n'est pas spécifique et les tissus sains environnants sont souvent détruits par les neutrophiles, ce qui accentue l'inflammation. De plus, les neutrophiles sont capables de dégranulation c'est-à-dire qu'ils libèrent des granules azurophiles contenant des agents antimicrobiens tels que les peroxydases<sup>4</sup> (*Kolaczowska et al., 2013*). Et finalement, les neutrophiles induisent leur propre mort en expulsant leur contenu en chromatine associé aux granules, ce qui forme un filet appelé NETs (neutrophils extracellular trap). Ce mécanisme appelé « Netosis » dépend de la formation des ROS (reactive oxygen species) et a pour but de neutraliser les agents infectieux et de limiter leur dissémination (*Brinkmann, V., Zychlinsky A., 2007*).

Dans la formation des NETs, il y a trois étapes (figure 5). La première est l'activation du neutrophile qui induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Sous l'effet des ROS, les membranes nucléaires commencent à se désintégrer. C'est la deuxième étape. La troisième consiste en la libération de la chromatine dans le cytosol qui va se mélanger aux granules. La dernière étape est la perte complète de l'intégrité du noyau et des granules. La cellule se contracte et expulse finalement les NETs (figure 6) (*Brinkmann, V., Zychlinsky A., 2007*).

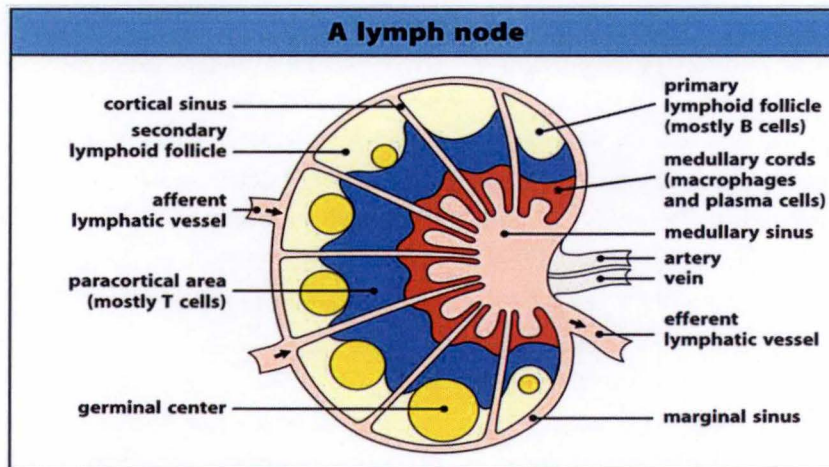
Les natural killers (NK) sont des lymphocytes granuleux. Ils appartiennent aux cellules de l'immunité innée, mais ont comme précurseurs les cellules lymphoïdes (figure 7). Les NK n'expriment pas de récepteur antigénique spécifique. Cependant, ces cellules sont caractérisées par le récepteur NK1.1 chez les souris. Les NK sont impliqués dans plusieurs mécanismes. Par exemple, l'évasion des tumeurs à l'immunité (*Vivier et al., 2013*). D'un point de vue immunologique, les NK ont une action rapide face aux pathogènes. Ce sont des cellules cytotoxiques qui induisent la mort des cellules infectées. Cette mort cellulaire induite par les NK dépend de la libération de perforine et granzyme. Ceux-ci libérés à proximité des cellules infectées permettent de créer des pores dans les membranes cellulaires, créant un canal aqueux. Ce canal permet l'entrée du granzyme qui va induire l'apoptose, c'est-à-dire la mort de la cellule cible. De plus, les NK peuvent aussi directement s'attaquer aux bactéries en libérant des agents antimicrobiens comme l' $\alpha$ -defensine (*Iannello et al., 2008*).

Les NK sont activés sous l'influence des cytokines. Les cytokines sont des éléments solubles permettant la communication entre cellules. Pour les cellules immunitaires, on parle plus spécialement des interleukines (IL). Les interleukines impliquées dans l'activation des NK sont IL-12, IL-15, IL-18, IL-2. De plus, les NK sont également des producteurs d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  dans le but de contrôler les infections. L'IFN- $\gamma$  active les macrophages pour la phagocytose, alors que le TNF- $\alpha$  permet de promouvoir l'activité cytotoxique (*Gregoire et al., 2006*).

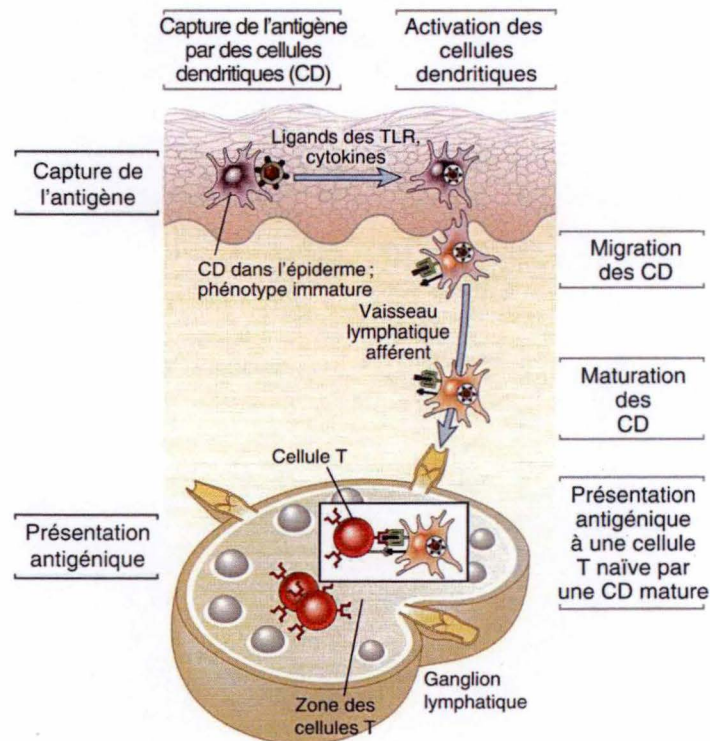
---

<sup>4</sup> Les peroxydases sont des enzymes de type oxydase qui décomposent les composés toxiques.





**Figure 8 - Structure anatomique d'un ganglion lymphatique.** Le ganglion est composé de follicules de lymphocytes B dans les zones du cortex et la zone du para cortex contenant les lymphocytes T (Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, Abbas et Lichtman, 2013)



**Figure 9 – Présentation antigénique et activation des lymphocytes dans le ganglion.** Capture d'antigènes par les cellules dendritiques de l'épiderme et présentation aux lymphocytes T naïfs après migration dans les ganglions lymphatiques (Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, Abbas et Lichtman, 2013)

## 2.3 Transition entre l'inné et l'adaptatif

L'activation de l'immunité adaptative se fait dans les organes lymphoïdes secondaires et est dépendante de l'interaction des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et des lymphocytes T naïfs.

### Les organes lymphoïdes

On distingue deux types d'organes lymphoïdes. Les organes lymphoïdes primaires (ou centraux) sont les lieux où les cellules lymphoïdes sont sélectionnées et se différencient. La moelle et le thymus constituent ces organes lymphoïdes centraux. La moelle osseuse assure la production des lymphocytes T et B et la maturation des lymphocytes B. Le thymus assure la maturation des lymphocytes T (*Abbas et Lichtman, 2013*).

Les organes lymphoïdes secondaires (ou périphériques) sont les ganglions lymphatiques, la rate et les MALT (tissus lymphoïdes associés aux muqueuses). Ce sont des lieux d'activation de l'immunité adaptative.

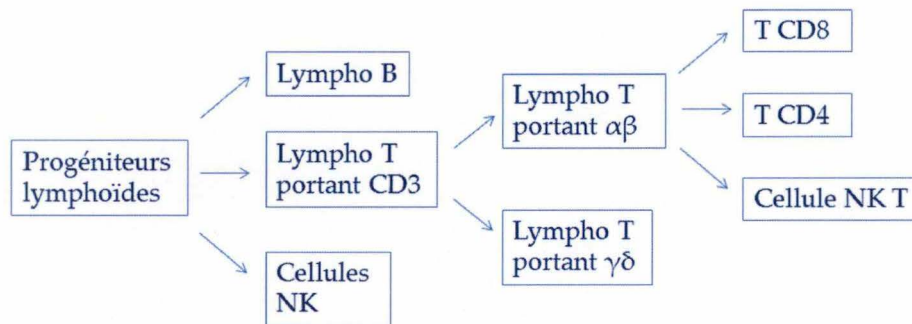
Les ganglions drainent la lymphe en provenance des tissus environnants. Les vaisseaux lymphatiques afférents en périphérie arrivent au niveau du sinus marginal et traversent le ganglion en passant par la zone corticale (cortex) et la zone médullaire (medulla) pour ressortir au niveau du hile (figure 8). Dans les ganglions lymphatiques, les lymphocytes B se trouvent dans des follicules situés à la périphérie, dans la zone corticale du ganglion. Les lymphocytes T sont concentrés à l'extérieur des follicules, dans la région appelée le paracortex, riches en veinules. Cette zone est le lieu de rencontre avec les cellules présentatrices d'antigènes (*Abbas et Lichtman, 2013*).

Dans la rate, le tissu lymphoïde est disposé autour d'artérioles subdivisées à partir de l'artère splénique. Les lymphocytes forment autour des artérioles des manchons de pulpe blanche, correspondant au cortex ganglionnaire. Comme pour celui-ci, la pulpe blanche possède une zone T diffuse et des follicules B (*Abbas et Lichtman, 2013*).

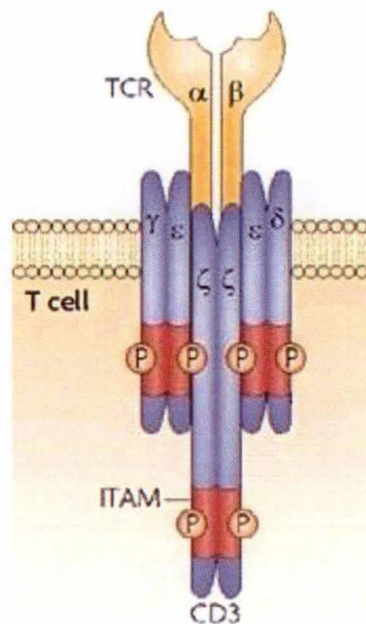
### Les cellules dendritiques : cellules présentatrices d'antigènes professionnelles

Les cellules dendritiques (DC) possèdent des activités de phagocytose et sont présentes dans tous les tissus de l'organisme et particulièrement dans les tissus en contact avec le milieu extérieur comme la peau. Les DC sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) par excellence. Comme déjà mentionné, les antigènes sont des motifs peptidiques dérivées d'un pathogène qui sont présentés aux cellules de l'immunité adaptative pour permettre leurs activations. Les DC assurent cette présentation. Les DC sont donc impliquées dans la discrimination des éléments du « soi » et des éléments étrangers au corps (non-soi).





**Figure 10 - Diagramme représentant l'arbre des lymphocytes.** Parmi les cellules différenciées de progéniteurs lymphoïdes, on retrouve les lymphocytes T et B et les Natural killers (vu précédemment). Au sein des lymphocytes T on retrouve différents sous-ensembles reprenant les Tαβ CD4-CD8-NKT et les Tγδ.



**Figure 11 – Structure du complexe TCR.** Le complexe TCR est composé des chaînes CD3 et des chaînes TCR. Dans cet exemple, les chaînes TCR choisies sont le α et β. Il existe également des TCR composés des chaînes γ et δ (modifiée à partir de *Gascoigne, 2008*)



En absence de pathogène, une fraction des DC tissulaires est soumise à une maturation homéostatique ce qui entraîne un changement phénotypique et morphologique ainsi que leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires (ganglions ou rate). Ce processus se fait en dehors des infections et donc ne nécessite pas de signaux TLR. Lors de cette migration, les DC transportent des motifs appartenant « au soi » dans les zones T des ganglions, ceci dans le but d'interagir avec ces lymphocytes T (figure 9). Si les T réagissent contre des antigènes du « soi », les DC activent la destruction ou la reprogrammation de ces lymphocytes. Si les T ne reconnaissent pas le « soi », les DC permettent de maintenir un état de sensibilité et de reconnaître uniquement les motifs étrangers (*Malissen et al., 2014*).

En présence de pathogène (figure 9), les DC entrent dans une phase terminale de différenciation (différente de la maturation homéostatique) (*Malissen et al., 2014*). Ils phagocytent le pathogène et le détruisent en conservant certains motifs : les antigènes. Les DC entament alors leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires (ganglions ou rate). Tout au long de cette migration, les DC mûrissent et expriment les antigènes à leur surface. Une fois arrivés dans la zone T des organes lymphoïdes, les DC présentent les antigènes aux cellules de l'immunité adaptative encore naïves (les lymphocytes T) par l'intermédiaire des complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC). Ceci permet l'activation et l'expansion clonale des lymphocytes T spécifiques de l'antigène présenté (*Malissen et al., 2014*).

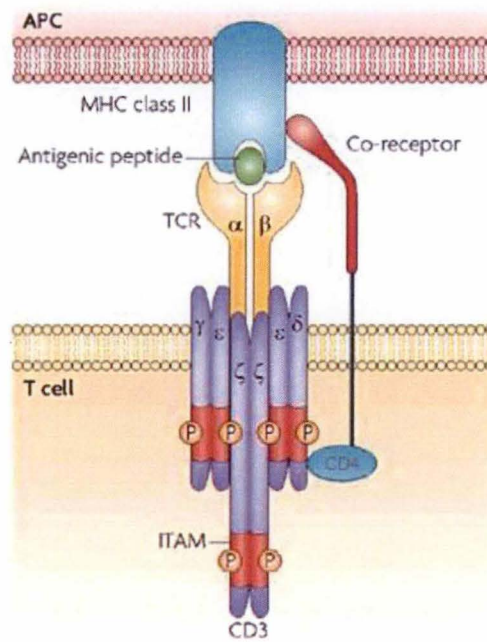
## 2.4 L'immunité adaptative

En fonction du type de pathogène rencontré, différents effecteurs et cytokines sont produits ce qui induit des réponses immunitaires différentes. Ceci permet de développer une immunité spécifique et plus efficace contre la pathogène.

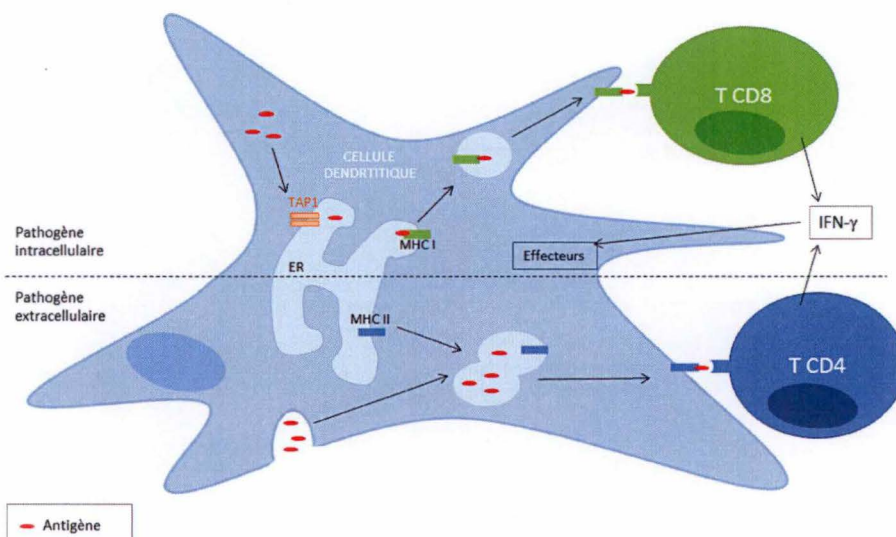
### Les lymphocytes : cellules de l'immunité adaptative

Parmi les cellules de l'immunité adaptative, on retrouve les cellules lymphoïdes T et B (figure 10). Les lymphocytes T sont subdivisés en plusieurs sous-ensembles détaillés ci-dessous. Les lymphocytes B sont les cellules mémoires de l'immunité.

Les lymphocytes T sont porteurs de deux marqueurs de surface caractéristiques. Premièrement, le récepteur CD3 (*cluster de différenciation 3*) qui peut présenter des chaînes différentes : CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  et CD3 $\epsilon$ , ainsi que les chaînes  $\zeta$ . Deuxièmement, le récepteur TCR (*T cell receptor*) qui peut être composé de combinaisons de chaînes différentes :  $\gamma\delta$  et  $\alpha\beta$ . L'association entre les chaînes CD3 et les chaînes TCR permet de former le complexe TCR impliqué dans la signalisation des lymphocytes T (figure 11) (*Gascoigne, 2008*). En plus du complexe TCR, les lymphocytes T portent d'autres clusters de différenciation comme le CD4 ou le CD8.



**Figure 12 – Interaction entre TCR et MHC pour activer les lymphocytes.** L'interaction entre le lymphocyte T naïf et la cellule présentatrice d'antigènes permet l'activation et la différenciation du lymphocyte T. Sur le schéma, la cellule présentatrice possède le MHCII, suite à la liaison d'un antigène d'origine extracellulaire. Le complexe MHCII-antigène va être présenté au lymphocyte T naïf possédant le CD4 (Gascoigne, 2008)



**Figure 13 - Présentation antigénique et activation de l'immunité adaptative.** Les antigènes dérivés de pathogènes intracellulaires sont pris en charge par le transporteur TAP1 qui permet l'entrée dans le réticulum endoplasmique (ER) afin que l'antigène se fixe au MHC I. Ce complexe ainsi formé permet l'activation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Les antigènes dérivés de pathogènes extracellulaires se retrouvent dans une vacuole qui va fusionner avec une vacuole contenant le MHCII. Le complexe MHCII-antigène est alors formé et est présenté aux lymphocytes naïfs qui se différencieront en T CD4.



Les lymphocytes T CD4 sont connus comme lymphocytes auxiliaires ou « Helper ». Leur activation dépend de l'origine de l'antigène présenté par les cellules présentatrices. Les lymphocytes T CD4 sont subdivisés en différents « subsets » selon leurs propriétés (voir point suivant). Ces lymphocytes sont les intermédiaires de la réponse immunitaire dans le sens où ils secrètent des cytokines afin d'initier et d'amplifier l'activation d'autres cellules immunitaires tels que des lymphocytes T cytotoxiques (CD8), des lymphocytes B et des cellules de l'immunité innée (macrophages et DC).

Les lymphocytes T CD8 sont connus pour leurs propriétés cytotoxiques. Ils reconnaissent les cellules infectées et les détruisent en libérant de la perforine et du granzyme, qui respectivement perforent les membranes des cellules infectées et déclenchent le mécanisme de mort cellulaire.

### Différenciation des lymphocytes TCD4/ TCD8

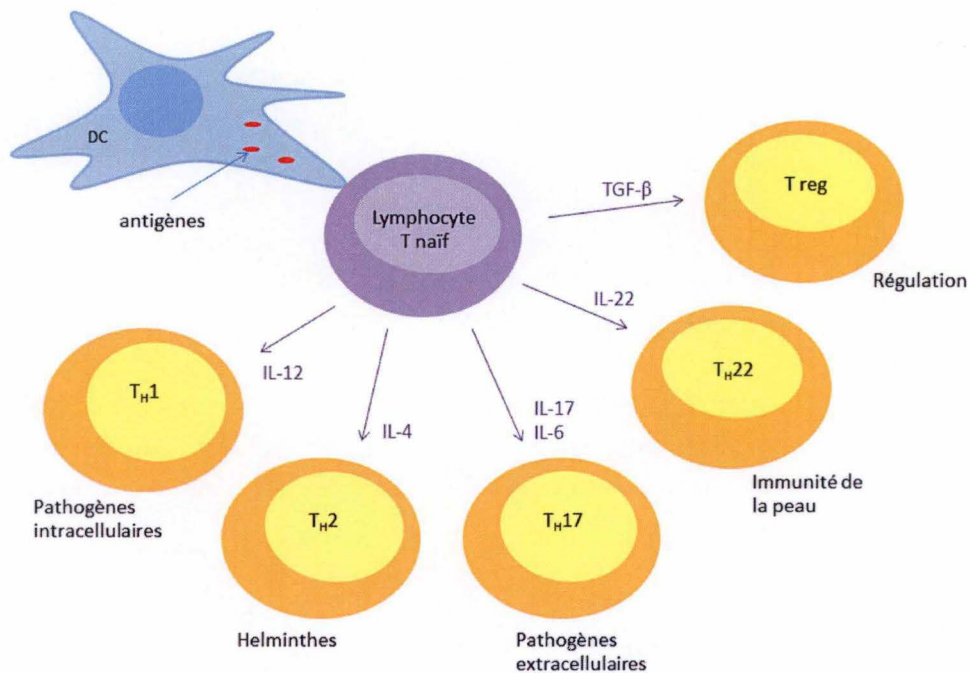
Selon l'origine intracellulaire ou extracellulaire de l'antigène, les cellules présentatrices, les MHCs et les lymphocytes T activés seront différents.

L'activation des lymphocytes est dépendante non seulement des antigènes présentés par les DC, mais aussi de différents signaux. Le premier provenant du MHC (complexe majeur d'histocompatibilité de classe), le second est un signal co-stimulateur et finalement des signaux solubles tels que les cytokines. Lorsque l'ensemble de ces signaux est présent, la différenciation des lymphocytes T naïfs en T activés a lieu. La figure 12 représente l'ensemble de ces interactions lors de la différenciation en T CD4 actif (*Gascoigne, 2008*).

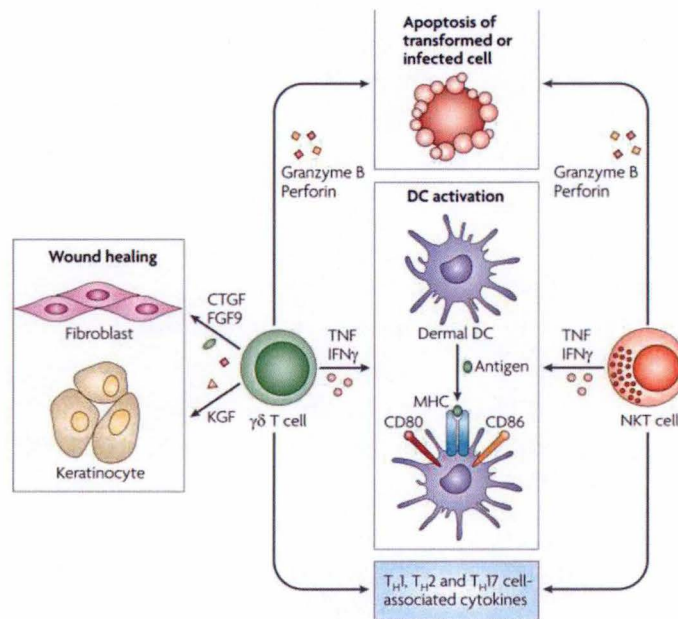
Lorsque le pathogène est extracellulaire, il est internalisé par les CPA au moyen de la phagocytose (bas de la figure 13). Le pathogène est dégradé au sein de la vacuole intracellulaire et ses motifs antigéniques sont conservés. Au même moment, dans le RE, des vacuoles contenant le MHC-II bourgeonnent et fusionnent avec la vacuole contenant les antigènes. Les antigènes se lient au MHCII et sont présentés aux lymphocytes T qui expriment le récepteur CD4. Ceux-ci, au contact de complexe antigène-MHCII et des molécules co-stimulatrices sont activés et induiront les mécanismes effecteurs au sein des cellules phagocytaires.

Cependant, si le pathogène est intracellulaire, il se localise dans le cytoplasme du CPA (haut de la figure 13). Via un transporteur TAP (transporter associated with antigen processing), l'antigène est emmené dans le réticulum endoplasmique (RE). Là, l'antigène est lié au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I). Le complexe antigène-MHCI est alors présenté aux lymphocytes T portant le récepteur CD8. Cette présentation ainsi que la présence de molécules co-stimulatrices permettent l'activation des fonctions cytotoxiques du T CD8.





**Figure 14 – L’orientation de la réponse immunitaire adaptative.** La réponse immunitaire varie en fonction du type de pathogène. Les cellules dendritiques ayant capturé les antigènes, migrant vers les organes lymphoïdes secondaires au niveau de la zone T où ils activent les lymphocytes T et orientent leur différenciation selon les antigènes présentés. Ce mécanisme permet une réponse adaptative spécifique à chaque pathogène.



**Figure 15 - Lymphocytes T non-conventionnels: les NKT et les  $\gamma\delta$ .** Ces deux types cellulaires ont des fonctions cytotoxiques en induisant l'apoptose des cellules infectées. Ils sont tous deux associés à l'orientation de la réponse immunitaire vers la T<sub>H</sub>1, la T<sub>H</sub>2 ou la T<sub>H</sub>17 en produisant les cytokines associées. Ils interviennent dans l'activation des DC de la peau. Une fonction supplémentaire pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$  est leur implication dans la réparation tissulaire. (Nestle et al., 2009)

## Différents « subsets » de T helper

Comme vu précédemment, les lymphocytes T Helper ( $T_H$ ) sont les T CD4 et sont subdivisés en différents « subsets » selon leurs propriétés fonctionnelles. Leur activation est différente selon qu'il s'agisse d'un pathogène intra- ou extra- cellulaire (figure 14).

Pour rappel, l'activation des lymphocytes naïfs est dépendante d'un contact direct avec les cellules présentatrices d'antigènes et les complexes MHC (vu précédemment). Mais en plus, elle nécessite des signaux solubles tels que les cytokines pour orienter la différenciation des lymphocytes. Parmi ces cytokines, les interleukines (IL) permettent la communication entre cellules immunitaires. En fonction du pathogène, les interleukines secrétées seront différentes ce qui oriente la différenciation vers une réponse immunitaire adaptée. Par exemple, l'IL-12 oriente la différenciation des lymphocytes auxiliaires vers une réponse de type  $T_H1$  adaptée aux bactéries intracellulaires. L'IL-6 et l'IL-17 orientent la réponse vers la  $T_H17$  en cas de pathogènes extracellulaires. L'IL-4 permet une réponse de type  $T_H2$  contre les helminthes (*O'Shea et Paul, 2010*). Ces différentes réponses ne seront pas détaillées par la suite, sauf pour la réponse de type  $T_H1$  qui est la réponse efficace contre *Brucella melitensis* (voir point 4).

Il existe également une réponse spécifique pour la peau appelée  $T_H22$ . Cette réponse immunitaire n'est pas encore bien comprise à ce jour. Néanmoins, la peau contient des types cellulaires spécifiques qui seront détaillés dans le point 3.

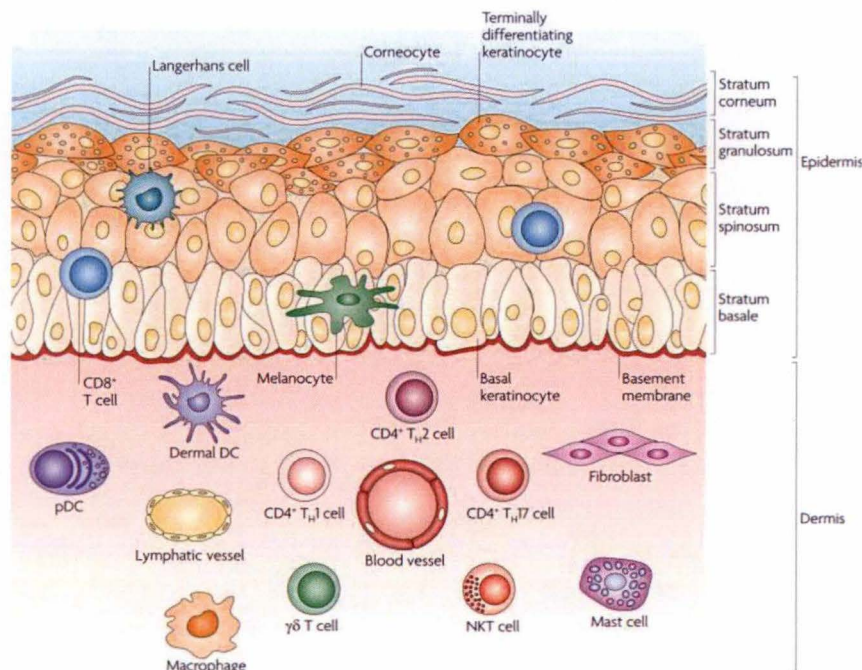
Finalement, il existe aussi des lymphocytes T régulateurs (Treg) localisés dans les organes lymphoïdes. Ils interagissent avec les DC et régulent l'expression des molécules co-stimulatrices afin d'imposer un seuil d'activation des lymphocytes (*O'Shea et Paul, 2010*). Dans le cas contraire, la réponse immunitaire pourrait devenir incontrôlable avec des conséquences dramatiques pour l'hôte.

## Les lymphocytes non-conventionnels

Plusieurs populations de lymphocytes sont dites non-conventionnelles. Ce sont les NKT et les  $T\gamma\delta$  (figure 15).

Les Natural killers T Cell (NKT) ne doivent pas être confondus avec les NK de l'immunité innée (vu précédemment). Les NKT, eux, font partie des lymphocytes de l'immunité adaptative portant le TCR  $\alpha\beta$ . Ces cellules partagent des caractéristiques propres aux cellules T (récepteur CD3 et TCR) mais aussi aux NK (récepteur NK1.1 chez les souris). La présence du TCR implique une activation préalable des NKT. Leur rôle est encore mal défini, mais leur absence provoque des maladies auto-immunes (*Nestle et al., 2009*). L'hypothèse la plus acceptée soutient que les NKT possèderaient un rôle de régulation en produisant des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , IL-2) mais aussi anti-inflammatoires (IL-10) (*Nestle et al., 2009*).





**Figure 16 – Structure de la peau et les cellules immunitaires résidentes.** Dans l'épiderme, les kératinocytes sont les cellules majoritaires. Les mélanocytes produisent le pigment de la peau. Les cellules immunitaires dominantes sont les cellules de Langerhans, un sous-type de DC. Et plus rarement, des T CD8 sont présents dans les couches inférieures de l'épiderme. Dans le derme, les composants principaux sont le collagène, les tissus élastiques et les fibres réticulaires. Le tissu contient des vaisseaux sanguins, lymphatiques et des fibres nerveuses. Comme cellules immunitaires, les mastocytes, les macrophages, les DC, les lymphocytes T activés sont présents, mais également des NKT et des T  $\gamma\delta$ . (Nestle et al., 2009)



Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  possèdent un récepteur TCR composé des chaînes  $\gamma$  et  $\delta$ . Ils apportent une contribution unique au système immunitaire (figure 15). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont localisés dans la peau et les muqueuses, principalement l'intestin. Ils sont auto-réactifs et peuvent agir rapidement en cas d'attaques pathogènes. Ils produisent de l'IFN- $\gamma$  et du TNF (facteur de nécrose tumorale) ce qui active les cellules dendritiques. Ils produisent aussi des cytokines associées à l'activation et à l'orientation des réponses immunitaires  $T_H1$ ,  $T_H2$  et  $T_H17$ , respectivement les interleukines 12, 4 et 17. De plus, les T  $\gamma\delta$  produisent aussi d'autres facteurs de croissances essentielles à la réparation tissulaire. De plus, ils ont une fonction cytotoxique et libèrent du granzyme et de la perforine afin de provoquer l'apoptose des cellules infectées. (Nestle et al., 2009 ; Vantourout et al., 2013)

### 3. La peau et son rôle dans l'immunité

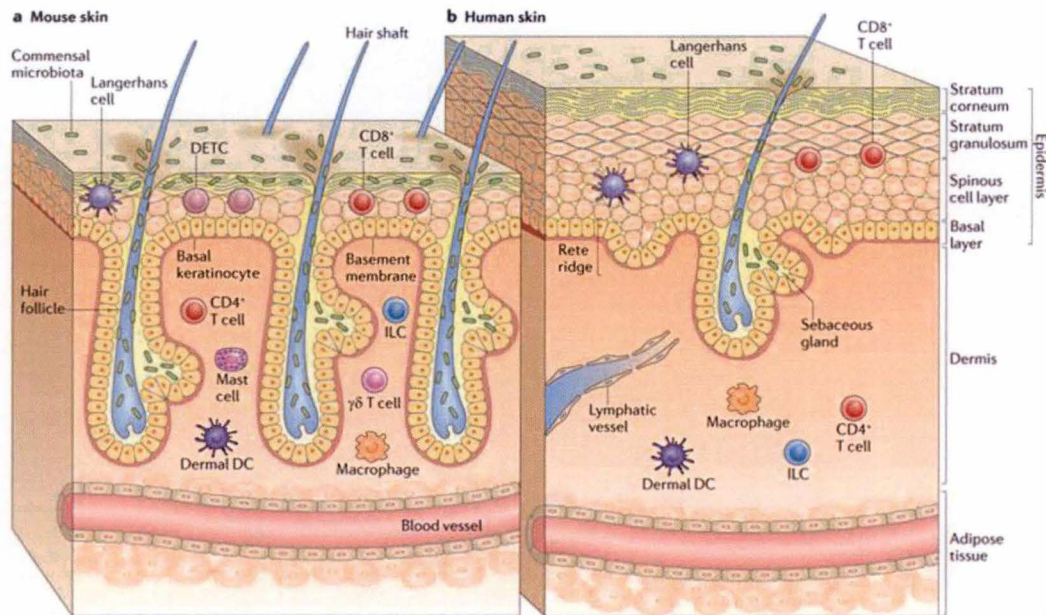
Il est connu depuis longtemps que la peau est une barrière physique, chimique et biologique importante contre la dessiccation et les infections. De plus en plus de données soutiennent aussi que la peau a des fonctions immunologiques actives (Nestle et al., 2009). Elle interviendrait aussi bien dans le maintien de l'homéostasie tissulaire que dans le cas d'attaques pathogènes. La structure de la peau est le reflet de sa complexité. Elle est constituée de différentes couches structurelles et fonctionnelles (figure 16).

L'épiderme est la couche extérieure de la peau, elle-même subdivisée en différentes strates (basale, épineuse, granuleuse et cornée) (Nestle et al., 2009). L'épiderme est composé de kératinocytes et est constamment en contact avec le milieu environnant. Dans l'épiderme, on retrouve les mélanocytes qui produisent la mélanine : le pigment de notre peau. Les cellules immunitaires dominantes dans l'épiderme sont les cellules de Langerhans (LC). Il s'agit d'un type de cellules dendritiques résidentes dans la peau. Plus rarement, des cellules T cytotoxiques CD8 peuvent être retrouvées dans la couche basale et épineuse (Nylen et al., 2012 ; Nestle et al., 2009 ; Pasparakis et al., 2014).

Après l'épiderme se trouve le derme, il est majoritairement composé de collagène, de tissus élastiques et de fibres réticulaires. Le derme est vascularisé et innervé, ce qui fournit les nutriments nécessaires au maintien de l'homéostasie de la peau (Nylen et al., 2012 ; Pasparakis et al., 2014).

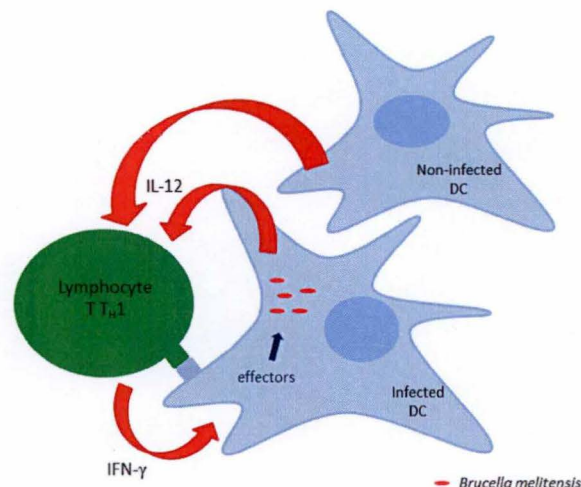
Il contient de nombreux types de cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes. Le derme contient également des sous-ensembles de lymphocytes activés lors d'infections. Ces T CD4 activés peuvent être  $T_H1$ ,  $T_H2$  ou  $T_H17$  en fonction du pathogène. La peau contient également des lymphocytes non-conventionnels comme les NKT et les  $\gamma\delta$ . Ces deux types cellulaires possèdent des fonctions cytotoxiques et produisent différentes cytokines. Ceci permet l'activation des DC de la peau, l'orientation des réponses vers la  $T_H1$ ,  $T_H2$  ou  $T_H17$ , et finalement la réparation des lésions (Nestle et al., 2009). Les granulocytes et les monocytes circulent dans les vaisseaux sanguins de la peau et s'extravasent rapidement lors d'une inflammation (Nylen et al., 2012).





Nature Reviews | Immunology

**Figure 17 – Différence dans la structure et la composition cellulaire de la peau chez la souris et chez l'homme.** L'épiderme est plus épais chez l'homme. A l'opposé, le derme est plus épais chez la souris. La proportion de follicules pileux est plus importante chez la souris par rapport à l'homme. Les types cellulaires sont globalement les mêmes. Les cellules immunitaires principales sont les cellules de Langerhans et quelques rares T CD8 dans l'épiderme et des macrophages, des DC, des TCD4 activés et des cellules lymphoïdes innées (ILC) dans le derme. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont absents de la peau chez l'homme. (Pasparakis M. et al., 2014)



**Figure 18 - Réponse de type  $T_H1$  efficace dans le cas d'infection par *Brucella melitensis*.** Les cellules dendritiques infectées par la bactérie produisent de l'interleukine (IL)-12. Des cellules non-infectées mais ayant détecté la présence du pathogène peuvent aussi produire de l'IL-12. En réponse à cette activation, les lymphocytes T produisent de l'interféron (IFN)- $\gamma$ , qui va stimuler des mécanismes effecteurs dans les cellules phagocytaires.

La peau saine contient plus de  $2 \times 10^{10}$  lymphocytes T résidents dans la peau chez l'homme, ce qui est le double du nombre total de lymphocytes T dans le sang. La plupart sont des T mémoires qui expriment des antigènes associés aux lymphocytes cutanés (CLA) (Clark et al., 2006).

La composition de la peau des souris est légèrement différente de celle de l'homme (figure 17). Mais globalement, on y retrouve les mêmes types cellulaires (Pasparakis et al., 2014). Ainsi, l'épiderme présente plus de couches cellulaires chez l'homme alors que chez la souris, c'est le derme qui est plus épais. La proportion de follicules pileux est plus importante chez la souris. Et finalement, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont absents de la peau de l'homme.

#### 4. Réponses immunitaires contre *Brucella*

*In vivo*, *Brucella* infecte principalement les cellules phagocytaires comme les macrophages et les cellules dendritiques (Copin et al., 2007 ; Gorbel et al., 1997). Comme pour la plupart des pathogènes intracellulaires, la réponse immunitaire efficace contre *Brucella melitensis* est orientée vers une réponse  $T_H1$  dépendante de l'IFN- $\gamma$ . Chez la souris, la réponse immunitaire contre *Brucella* est généralement étudiée dans un modèle d'infection intrapéritonéal.

##### 4.1 Le modèle d'étude *in vivo* : *Mus musculus*

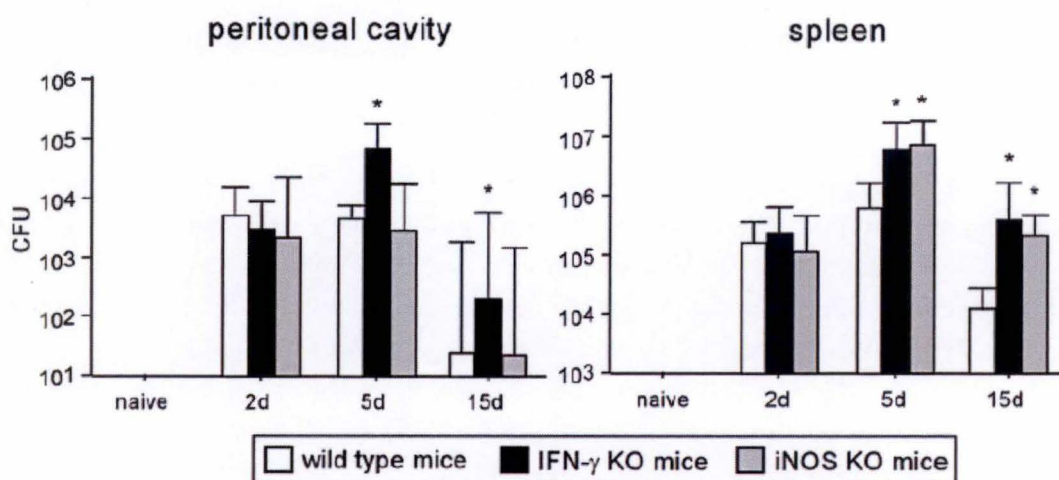
Le modèle de souris est couramment utilisé dans ce type de recherche. La réponse immunitaire de la souris contre *Brucella melitensis* est similaire à celle observée chez l'homme, à l'exception de l'absence de fièvre ondulante (Silva et al., 2011). Toutes les études de l'infection de *Brucella in vivo* sont réalisées chez la souris.

##### 4.2 Le modèle intrapéritonéal

Le modèle d'infection en intrapéritonéal (IP) est le modèle communément utilisé en immunologie pour étudier les réponses immunitaires face à un pathogène. Ce premier modèle a permis de générer une grande quantité d'informations sur le type de réponse immunitaire activé contre *Brucella*.

L'immunité cellulaire joue un rôle important dans cette réponse (Yongyun Il, 2012; Vitry et al, 2012). Le modèle IP a identifié les cellules hôtes de *Brucella* comme étant les monocytes (macrophages et cellules dendritiques). Ceux-ci infectés par la bactérie produisent de l'interleukine (IL)-12. Des cellules non-infectées mais ayant détecté la présence du pathogène peuvent aussi produire de l'IL-12. Cette cytokine oriente l'activation des lymphocytes T naïfs vers la  $T_H1$  dans les organes lymphoïdes secondaires (figure 18).





**Figure 19 – Variation de la charge bactérienne dans la cavité péritonéale et la rate de souris C57BL/6 sauvage, déficiente pour l'IFN- $\gamma$  et pour l'iNOS.** La dose infectante étant de  $4 \times 10^4$  CFU de *B. melitensis*. Cinq jours après l'infection, il y a 10 fois plus de bactéries dans la rate des souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$  et pour l'iNOS par rapport aux souris sauvages. En revanche, dans la cavité péritonéale, seules les souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$  affichent des titres bactériens plus élevés que pour les souris sauvages. Ces données suggèrent que l'IFN- $\gamma$  et l'iNOS jouent tous deux un rôle dans le contrôle de l'infection dans la rate alors que dans la cavité péritonéale seul l'IFN- $\gamma$  semble important (Copin et al., 2007).

En réponse à cette activation, les lymphocytes T migrent vers le site de l'infection pour devenir des cellules effectrices et produisent de l'interféron (IFN)- $\gamma$ . Il a été démontré qu'une des fonctions principales de l'IFN- $\gamma$  est la stimulation des mécanismes effecteurs dans les cellules phagocytaires, comme la production des RNS ou de ROS (*Zhan et Cheers, 1993 ; Chakravorty et al, 2003 ; Copin et al., 2007*)

Une étude a démontré que les souris déficientes pour l'iNOS (l'enzyme produisant le NO) étaient beaucoup plus susceptibles à l'infection par *B. abortus* que les souris déficientes pour gp91phox, ce qui suggère un rôle prédominant des RNS (*Ko et al., 2002*). En se basant sur ces données, l'iNOS a donc été sélectionné comme marqueur de protection contre *Brucella*. IFN- $\gamma$  stimule l'activité de l'iNOS dans les cellules dans la rate et de la cavité péritonéale. De plus, les souris KO pour l'IFN- $\gamma$  présentent une fréquence de cellules positives pour l'iNOS réduite de 10 fois (*Copin et al., 2007*).

L'IFN- $\gamma$  semble donc avoir un rôle clé dans le contrôle de l'infection de *Brucella*. De même, des souris knockout pour la voie de signalment de l'IFN- $\gamma$  sont très sensibles aux infections (*Jiang et al., 1993 ; Murphy et al, 2001 ; Balwin, 2002*). L'implication de l'IFN- $\gamma$  et de l'iNOS dans la résistance dans l'infection de *Brucella* a principalement été mise en évidence dans le modèle IP (figure 19) (*Zhan et Cheers, 1993 ; Murphy et al, 2001 ; Ko et al., 2002 ; Copin et al., 2007*).

Le pic d'infection chez les souris infectées en IP est atteint à 5 jours post-infection. A ce pic, les principaux producteurs de l'IFN- $\gamma$  sont les NK, les lymphocytes T CD4 et T CD8. Dans les 10 à 21 jours post-infection, seuls les T CD4 produisent encore la cytokine. Cette étude a aussi démontré que les souris déficientes pour les T CD4 sont plus susceptibles à l'infection que les souris T CD8, ce qui suggère un rôle crucial des T CD4 dans la protection contre *Brucella* (*Copin et al. 2007*).

Une fois activés, certains lymphocytes T migrent ensuite vers le lieu de l'infection pour devenir des cellules effectrices, alors que d'autres restent dans les ganglions lymphatiques ou la rate. Ceux-ci peuvent, dans un deuxième temps, activer des lymphocytes B qui produisent alors des anticorps spécifiques<sup>5</sup> contre la bactérie. C'est la réponse humorale (*Copin et al, 2007*).

Des recherches antérieures sur des souris ont révélé que *Brucella* persiste dans la rate, le foie, les ganglions lymphatiques (*Atluri et al., 2011*) ainsi que dans la patte et la queue (*Splitter et al., 2013*). Un des mécanismes de contention de *Brucella* est le granulome. C'est la structure mise en place quand un pathogène résiste aux défenses immunitaires. Ce mécanisme permet normalement de contenir les pathogènes et de les détruire. Différents modèles d'infection par des pathogènes intracellulaires comme *Mycobacterium tuberculosis* et *Listeria monocytogene* ont démontré l'importance des granulomes dans le contrôle du pathogène (*Rajashekara et al., 2005 ; Russell et al., 2009 ; Kang et al., 2008*).

---

<sup>5</sup> Les anticorps anti-*Brucella* sont des isotypes IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>2A</sub>



Dans certains cas comme pour *Brucella*, le pathogène persiste et se multiplie au sein du granulome. Lorsque l'immunocompétence diminue, le granulome cède et les pathogènes sont libérés. Le granulome est composé de plusieurs types cellulaires. Les cellules infectées, que le système n'arrive pas à éliminer, sont entourées par des macrophages et des DC non-infectées. Leur but étant de contenir les pathogènes à l'intérieur. Le développement de la réponse adaptative permettra l'arrivée d'une couronne de lymphocytes T qui compléteront la structure (Bolt et Ernst, 2008 ; Copin et al., 2012).

Malgré toutes les découvertes qu'il a permis, le modèle en IP n'est pas un modèle très physiologique bien que la réponse due à une infection au niveau de la conjonctive soit fortement liée à celle observée en IP.

### 4.3 Le modèle intranasal

Pour être plus proche de la réalité et des voies de transmission de *Brucella*, le modèle d'infection en intranasal (IN) a été mis au point. L'aérosol est en effet une des voies de dissémination de *Brucella*. L'impact a donc été étudié dans les poumons de souris infectées ainsi que dans le foie et la rate (Delphine Hanot-Membres et Arnaud Machelart, soumis en 2014). Dans ce modèle<sup>6</sup>, en plus de la réponse classique  $T_H1$ , une participation de la réponse  $T_H17$  avec l'intervention de l'IL-17 au niveau du poumon a pu être observée. Dans le poumon, les principales cellules infectées sont les macrophages alvéolaires. Parmi les effecteurs, on retrouve les monocytes : leur infiltration dans les alvéoles pulmonaires correspond à l'élimination de *Brucella* dans les poumons. La production d'IFN- $\gamma$  dans le poumon joue un rôle essentiel. Notons que les cellules qui produisent l'IFN- $\gamma$  dans les poumons ne sont pas encore identifiées à ce jour.

## 5. Notre modèle d'infection cutanée

En dehors des transmissions orales et par aérosols, l'infection peut aussi être due à un contact direct entre *Brucella* et une lésion cutanée. Comme mentionné précédemment, certains groupes professionnels ayant des contacts réguliers avec des animaux sont plus à risque. Avoir la peau endommagée peut alors être une voie d'entrée facile pour *Brucella* (Galinska E.M., Zagorski J., 2013). Des études expérimentales chez les cobayes avaient déjà démontré qu'il était beaucoup plus facile de contaminer les animaux en appliquant *Brucella* sur la peau que par ingestion orale (Spink W.W., 1956). De plus, une expérience dramatique sur des prisonniers aux États-Unis dans les années 60 démontre que l'application de *Brucella* sur la peau abrasée cause systématiquement la maladie (Spink W.W., 1956).

---

<sup>6</sup> Ces données sont en cours de publication (Delphine Hanot-Membres et Arnaud Machelart - UNamur)



Au vue de toutes ces observations, un nouveau modèle d'infection a été mis en place dans le but d'étudier l'infection cutanée de *Brucella*. Comme pour les autres modes d'infection, les souris seront le modèle d'infection *in vivo*. Le choix de la souche C57 sauvage dans le cadre de cette étude s'est basé sur le fait qu'elle possède une réponse préférentiellement T<sub>H</sub>1, qui est la réponse efficace contre *Brucella*.

Les souris sont infectées au niveau du coussinet plantaire, créant ainsi la lésion cutanée. Un large panel de souris génétiquement déficientes permet de comparer leurs réponses immunitaires et de suivre les différents éléments impliqués dans le contrôle de l'infection par *Brucella melitensis*.

Les souris utilisées dans cette étude ont toutes un background de C57BL/6 et sont déficientes pour :

- le récepteur des chemokines C-C (CCR2) impliqués dans l'infiltration des monocytes
- le récepteur de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R) impliqué dans l'activation des monocytes *voir figure 18*
- le transporteur associé au transport des antigènes cytosoliques (TAP-1) *voir figure 13*
- le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II des voies dépendantes de présentation de l'antigène exogène (MHCII) *voir figure 13*
- le récepteur CD3 présent sur toutes les cellules lymphoïdes T *voir figure 10*
- le récepteur MuMT impliqué dans l'activation des lymphocytes B
- l'enzyme iNOS, effectrice de la réponse anti-*Brucella*
- la lymphotoxine  $\beta$  (LT $\beta$ ) qui permet la structuration des organes lymphoïdes périphériques (ganglions et rate)

L'infection cutanée a déjà été réalisée dans les modèles d'étude du parasite *Leishmania spp.* Dans ce modèle, *Leishmania* est injecté au niveau du coussinet plantaire des souris. Nous utilisons ce modèle comme référence pour l'infection cutanée par *Brucella melitensis*.

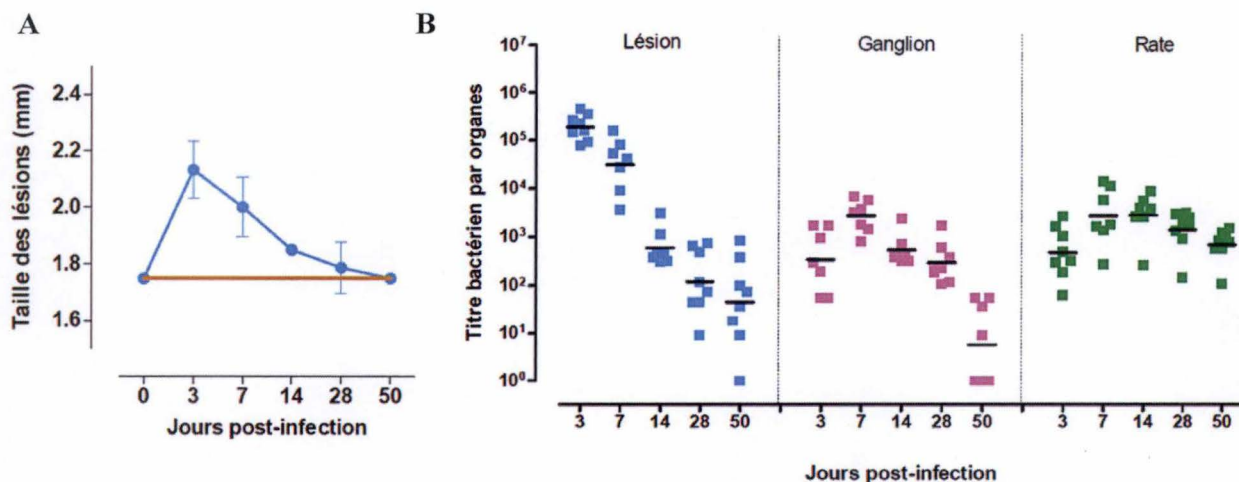
Nos objectifs sont donc déterminer les types cellulaires infectés par *Brucella*, d'identifier les cellules recrutées au niveau du site d'infection, de caractériser les cellules effectrices et d'étudier le rôle de ces cellules immunitaires dans le contrôle de l'infection et la formation de la lésion. Suite à ces résultats, les voies d'activation des lymphocytes et la production d'IFN- $\gamma$  seront étudiés au niveau du ganglion lymphatique poplité qui draine directement le site de l'infection.

Dans la discussion, nous établirons les comparaisons entre les deux modèles d'infection cutanée : *Brucella* et *Leishmania*. Nous comparerons également les réponses immunitaires entre les différentes voies d'infection intrapéritonéale, intranasale et intradermale.

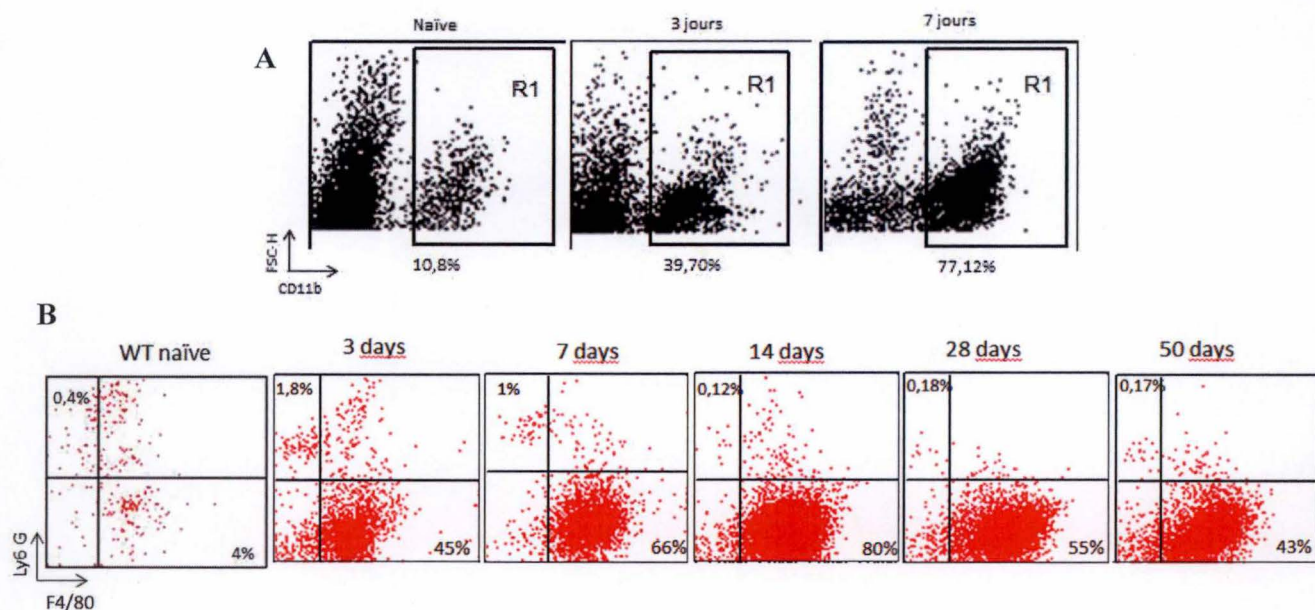
## Résultats

---





**Figure 20 – Variation de la taille des lésions (A) et de la charge bactérienne (B) dans la patte, le ganglion poplité et la rate de souris C57BL/6 sauvage (WT).** La dose infectante étant de  $2 \times 10^6$ /ml CFU de *Brucella melitensis*. Trois jours après l'infection, la taille de la lésion est maximale, et la charge bactérienne dans la lésion correspond approximativement à la dose infectante. En revanche, dans le ganglion et la rate, la charge bactérienne continue d'augmenter jusqu'à 7 jours après l'infection. La rate est le seul organe où la bactérie persiste jusqu'à 50 jours chez tous les individus.



**Figure 21 – Mesure du recrutement de cellules myéloïdes (CD11b<sup>+</sup>) dans la lésion des souris WT naïves et infectées (A) et le phénotypage de ces cellules (B) à différents temps post-infection.** A 3 jours post-infection, des cellules CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> F4/80<sup>+</sup> (monocytes) sont recrutées au niveau des pattes des souris infectées. Ce recrutement persiste jusqu'à 50 jours après l'infection. Ces données suggèrent l'implication des monocytes dans l'élimination de la bactérie de la lésion.

## Résultats

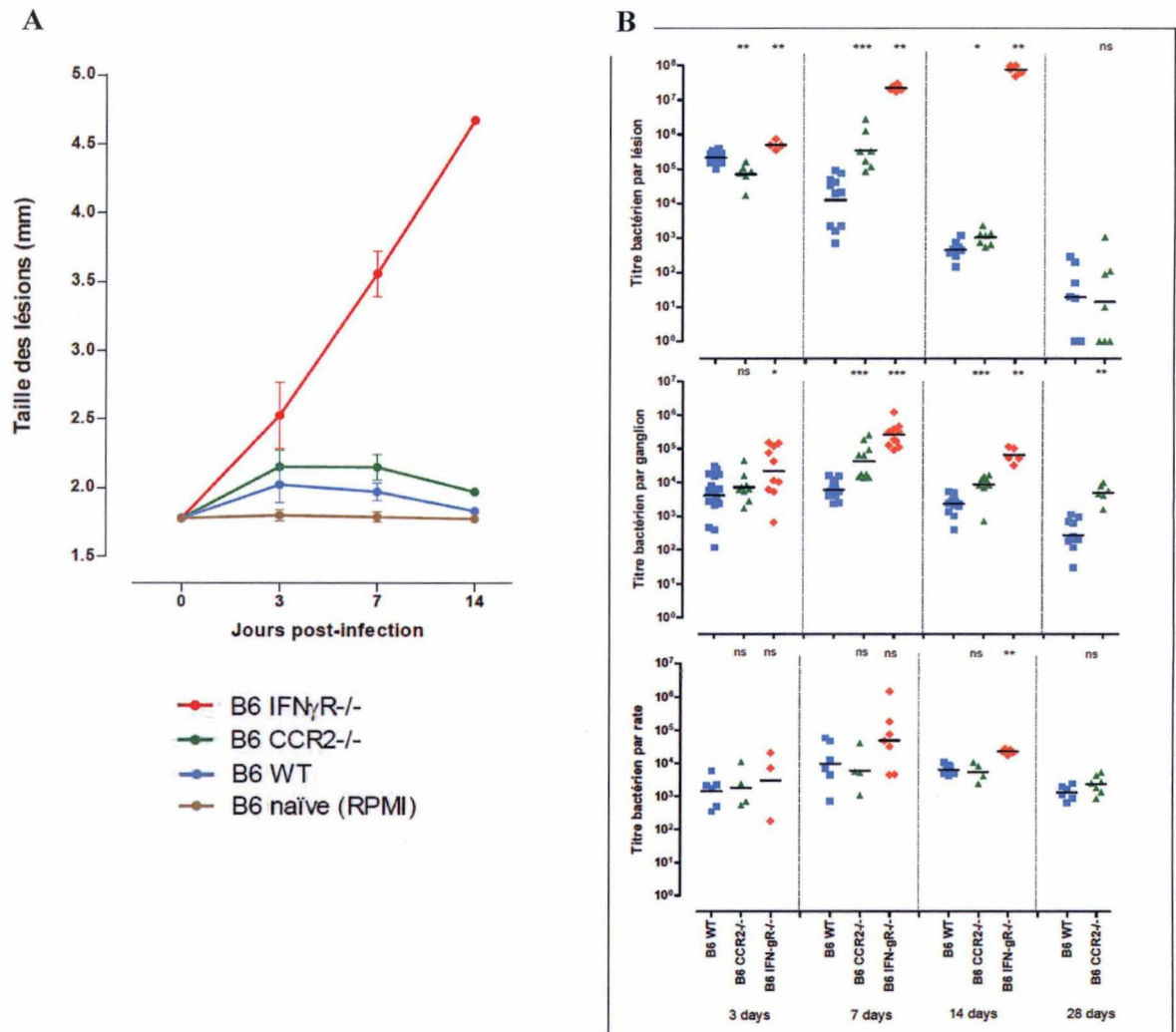
### 1. Suivi de l'infection par *Brucella melitensis* chez les souris C57BL/6 WT et déficientes

Afin d'induire une lésion cutanée, les souris C57BL/6 sont infectées au niveau du coussinet plantaire avec 20µl d'une suspension contenant  $2 \times 10^6$  CFU de *Brucella melitensis*. Pour évaluer l'évolution de la lésion, nous avons mesuré le gonflement inflammatoire au niveau du coussinet plantaire à différents temps post-infection. Ce gonflement inflammatoire sera repris sous le terme de « taille de la lésion ». L'épaisseur moyenne d'un coussinet plantaire non-infecté varie entre 1,7 et 1,8 mm. Les résultats (figure 20A) montrent que le pic de gonflement pour les souris de type sauvages (WT) est atteint à 3 jours. Dans un deuxième temps, l'évolution du titre bactérien dans la lésion cutanée, le ganglion poplité et la rate a été évalué (figure 20B). A 3 jours, la charge bactérienne correspond approximativement à la dose infectante injectée dans la lésion. Par la suite, une décroissance rapide du titre bactérien est observée. A 50 jours post-infection, la charge bactérienne a fortement diminué et la patte retrouve son aspect normal. Dans les organes lymphoïdes (ganglion et rate), la charge bactérienne continue d'augmenter jusqu'à 7 jours après l'infection. La rate est le seul organe étudié où la bactérie persiste chez tous les individus à des taux significatifs à 50 jours post-infection.

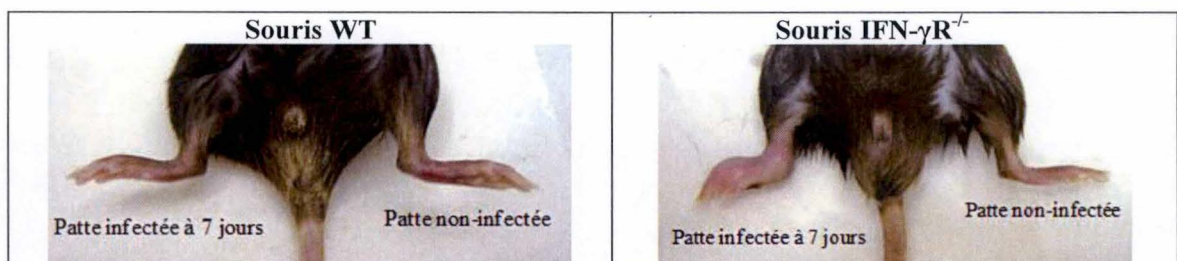
Nous avons ensuite analysé, par cytométrie de flux, le phénotype des cellules recrutées au site d'infection. Les résultats montrent un recrutement de cellules dans la lésion cutanée des souris infectées par rapport aux souris naïves (figure 21A). Celles-ci sont majoritairement positives pour le marqueur membranaire CD11b<sup>+</sup>, typique des cellules myéloïdes. Un phénotypage plus approfondi de ces cellules indique que la majorité des cellules est positive pour le marqueur F4/80<sup>+</sup> caractéristique des monocytes (principalement des macrophages) et un plus faible pourcentage est positif pour le marqueur Ly6G caractéristique des neutrophiles. Ce recrutement de cellules CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> F4/80<sup>+</sup> apparaît au moment où le titre bactérien et la taille de la lésion diminuent. Ce recrutement persiste jusqu'à 50 jours post-infection. Ces données suggèrent l'implication des monocytes dans le contrôle de l'infection cutanée par *Brucella*.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, l'infection a été étudiée chez des souris déficientes pour l'infiltration des monocytes (CCR2<sup>-/-</sup>) et pour leur différenciation et leur activation (IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>). Pour les souris CCR2<sup>-/-</sup>, on observe un plateau pour la taille de la lésion entre 3 et 7 jours post-infection. Le pic de la charge bactérienne dans la lésion est, quant à lui, retardé à 7 jours post-infection au lieu de 3 jours pour les souris WT (figure 23). Dans la phase tardive de l'infection (14 et 28 jours), le titre bactérien rejoint celui de la WT pour tous les organes. Les bactéries sont presque éliminées de la lésion à 28 jours, alors qu'elles persistent dans le ganglion et la rate. L'analyse cytométrique démontre un retard dans le recrutement des monocytes dans la patte (figure 25). A 3 jours post-infection, une partie de cellules recrutées sont Ly6G<sup>+</sup> (neutrophiles). Ce premier recrutement laisse place à des cellules F4/80<sup>+</sup> (monocytes) à 7 et 14 jours post-infection. Une nouvelle fois, ce recrutement tardif de monocytes est corrélé à la chute du titre bactérien et la diminution de l'épaisseur de la lésion.





**Figure 23 – Variation de la taille des lésions (A) et de la charge bactérienne (B) dans la lésion, le ganglion poplité et la rate de souris WT et déficientes pour CCR2 et IFN- $\gamma$ R.** La taille de la lésion et le titre bactérien pour la souris IFN- $\gamma$ R $^{-/-}$  augmente significativement jusqu'à 14 jours post-infection. Pour la souris CCR2 $^{-/-}$ , la taille de la lésion fait un plateau entre 3 et 7 jours. La charge bactérienne dans la lésion augmente jusqu'à 7 jours avant de rejoindre la cinétique WT.



**Figure 24 – Comparaison de l'évolution de la lésion entre une souris WT et une déficiente pour IFN- $\gamma$ R.** La patte à gauche sur l'image est infectée à 7 jours. La patte à droite sur l'image est non-infectée. La patte infectée de la souris WT comparable à la patte non-infectée. Un gonflement important et un point de nécrose sont observés pour la patte infectée de la souris IFN- $\gamma$ R $^{-/-}$ .

Les souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$ R présentent un gonflement inflammatoire important et une lésion nécrotique. La charge bactérienne dans la lésion augmente de manière importante pour atteindre  $10^8$  CFU à 14 jours post-infection (figure 23). La présence de nécrose a été observée entre 7 et 14 jours après l'infection<sup>7</sup> (figure 24). L'analyse cytométrique démontre un recrutement exclusif de neutrophiles et un défaut dans le recrutement de monocytes (figure 25). L'important recrutement de neutrophiles est corrélé au développement d'une lésion nécrotique.

L'ensemble de toutes ces données suggère un rôle essentiel des monocytes dans le contrôle de l'infection cutanée par *Brucella*. Nous confirmons également dans ce modèle, le rôle clé du récepteur à chemokine (CCR2) dans le recrutement des monocytes et de la voie de signalisation de l'IFN- $\gamma$  dans la différenciation et l'activation des monocytes.

Les différents recrutements cellulaires ainsi que les bactéries ont été analysés en immunofluorescence. La figure 26 représente une coupe transversale de la patte d'une souris WT naïve. Un marquage DAPI (ADN) et Phalloïdine (actine) permet d'identifier les différentes structures de la peau. On peut reconnaître l'épiderme, le derme et les fibres musculaires sous-jacents (figure 26B).

La coloration par anticorps GR1 (anti Ly6G/C), pour identifier les neutrophiles, a été utilisée sur la cinétique complète des souris WT (figure 27). Dix minutes après l'infection, les bactéries sont observées dans le derme. Les cellules ne semblent pas infectées à ce stade. Ceci suggère que *Brucella* est extracellulaire dans les temps très précoces de l'infection. Un recrutement précoce de neutrophiles est observé à 10 minutes post-infection. Celui-ci semble se maintenir à 2 heures post-infection, mais diminue progressivement jusqu'à disparaître complètement deux semaines après l'infection.

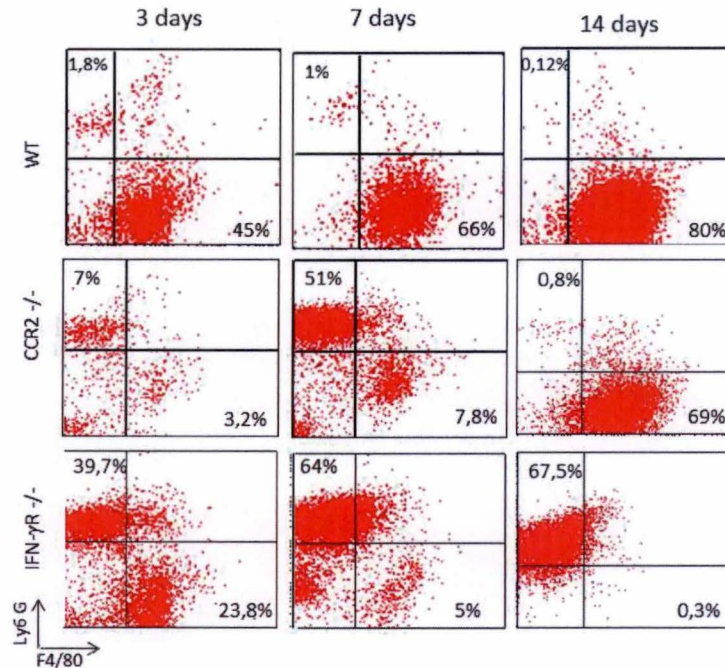
La coloration MHCII a permis d'identifier les monocytes chez les souris WT (figure 28). Dans la souris naïve, les cellules de Langerhans sont marquées dans l'épiderme. Les cellules de Langerhans sont les cellules dendritiques spécialisées de la peau (*Nestle et al., 2009*). L'analyse montre un recrutement de cellules MHCII<sup>+</sup> dans le derme à 3 et 7 jours post-infection. En conclusion, les données obtenues en immunofluorescence suggèrent que le premier recrutement précoce composé de neutrophiles à 10 min et 2 heures post-infection laisse place à un recrutement des monocytes à long terme.

Quant aux types cellulaires infectés par *Brucella*, les cellules positives pour GR1 (neutrophiles) ne semblent pas infectées (figure 29). Une faible proportion des cellules infectées est MHCII<sup>+</sup>. La majorité des cellules infectées restent cependant MHCII<sup>-</sup>. Ces résultats préliminaires excluent les neutrophiles comme cellules hôtes, mais ne permettent pas de déterminer clairement le phénotype des cellules infectées.

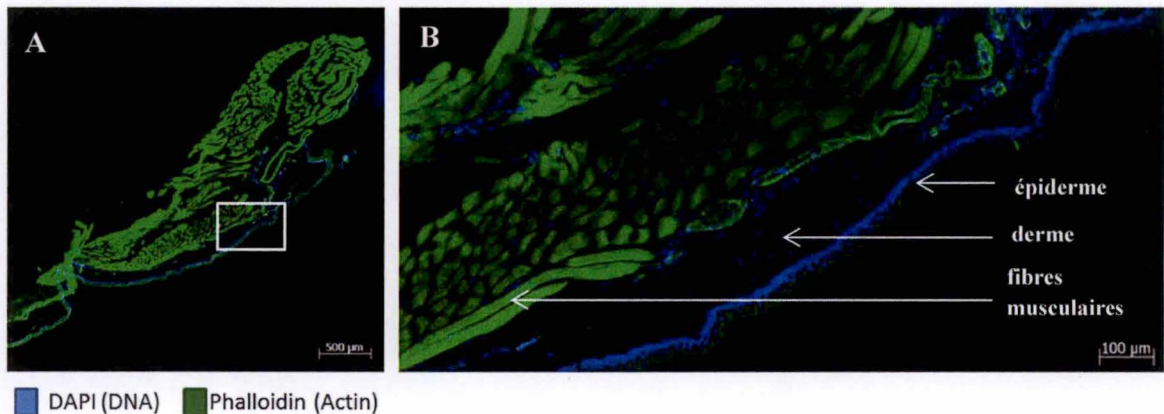
---

<sup>7</sup> Remarque : pour des raisons éthiques, en raison du gonflement important des pattes et de l'apparition de nécrose, l'infection des souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> a été limitée à 14 jours.

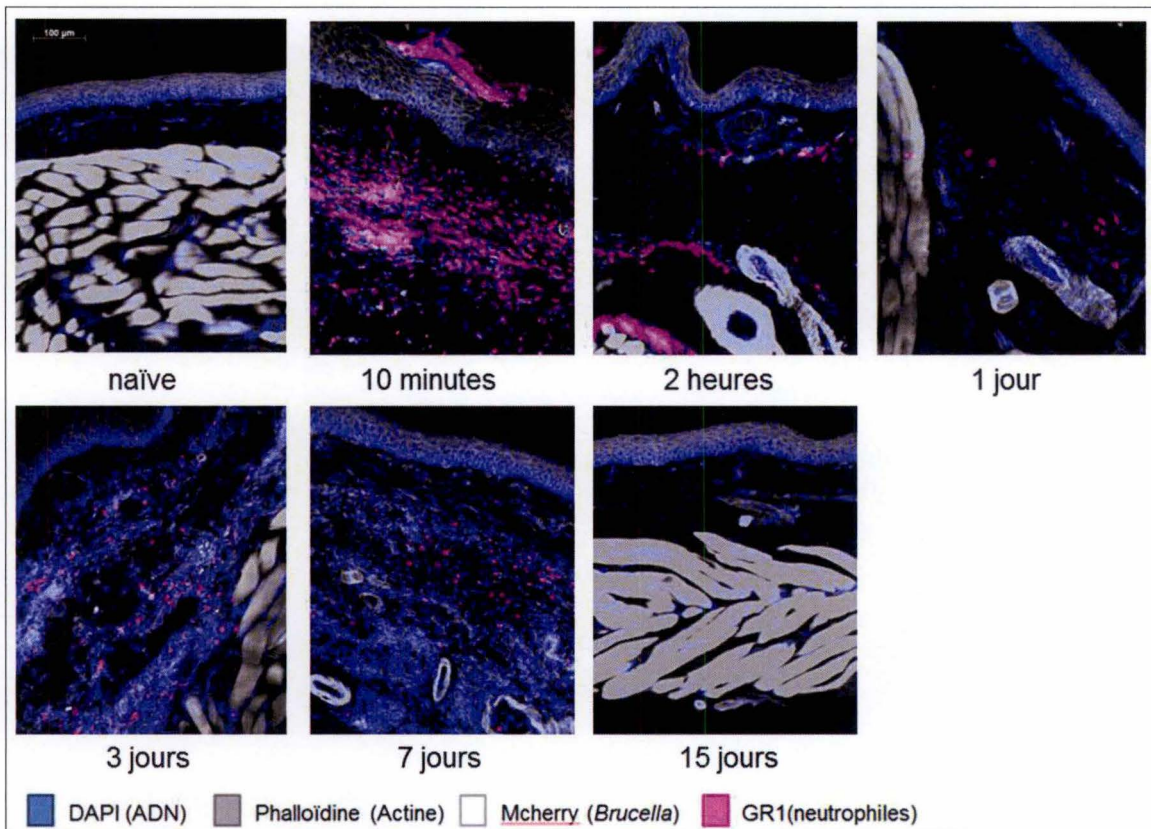




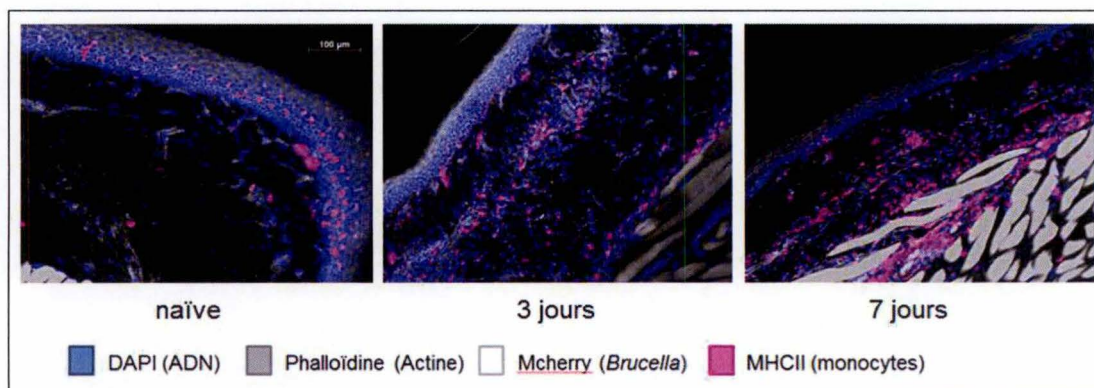
**Figure 25 – Phénotypage des cellules myéloïdes CD11b<sup>+</sup> recrutées dans la lésion des souris WT et déficientes pour CCR2 et IFN-γR.** Pour la souche WT, les cellules sont CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> F4/80<sup>+</sup> correspondant à des monocytes. Pour les souris CCR2<sup>-/-</sup>, les cellules recrutées à 3 et 7 jours sont positives pour le marqueur des neutrophiles (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>). Ce premier recrutement disparaît à 14 jours post-infection pour laisser place aux monocytes (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> F4/80<sup>+</sup>). Cependant, le recrutement cellulaire observé chez les souris IFN-γR<sup>-/-</sup> est exclusivement composé de neutrophiles (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>). Les pourcentages indiquent le pourcentage de cellules positives pour les marqueurs F4/80 ou Ly6G par rapport au nombre total de cellules étudiées.



**Figure 26 – Structure du tissu cutané chez souris WT naïve.** Un marquage DAPI - Phalloïdine permet d'identifier les différentes couches cellulaires de la patte. Le DAPI marque l'ADN. La Phalloïdine marque les filaments d'actine. La figure A représente une coupe complète de la patte d'une souris naïve. La figure B est un agrandissement de la A au niveau du rectangle blanc.

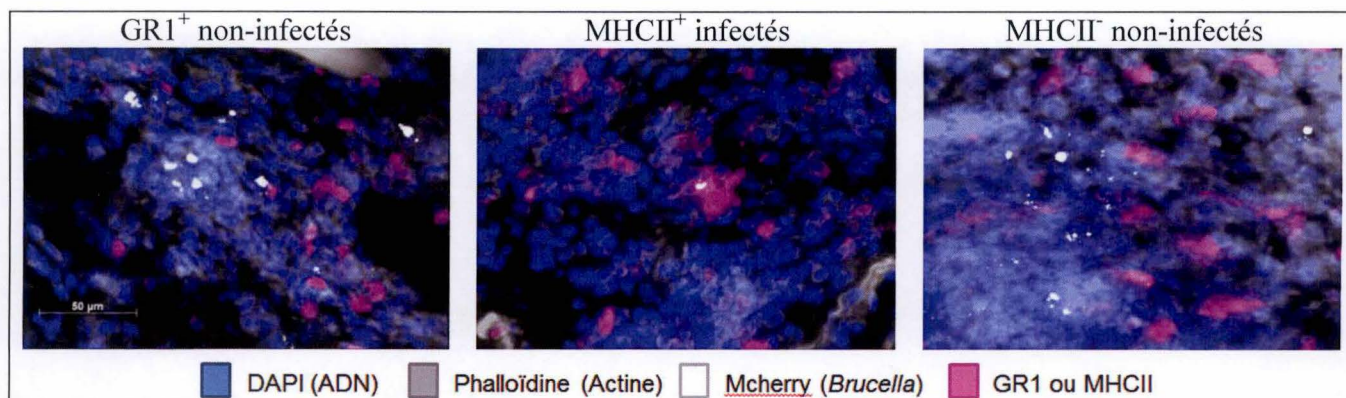


**Figure 27 – Recrutement de cellules GR1<sup>+</sup> dans la lésion cutanée de souris WT à différents temps post-infection.** La coloration DAPI Phallo GR1 permet d'identifier les neutrophiles recrutés lors de l'infection. Dix minutes après l'infection des souris WT, un recrutement cellulaire GR1<sup>+</sup> dans le derme est visible dans les souris infectées comparées aux souris naïves. Ce recrutement diminue progressivement jusqu'à disparaître complètement après deux semaines.

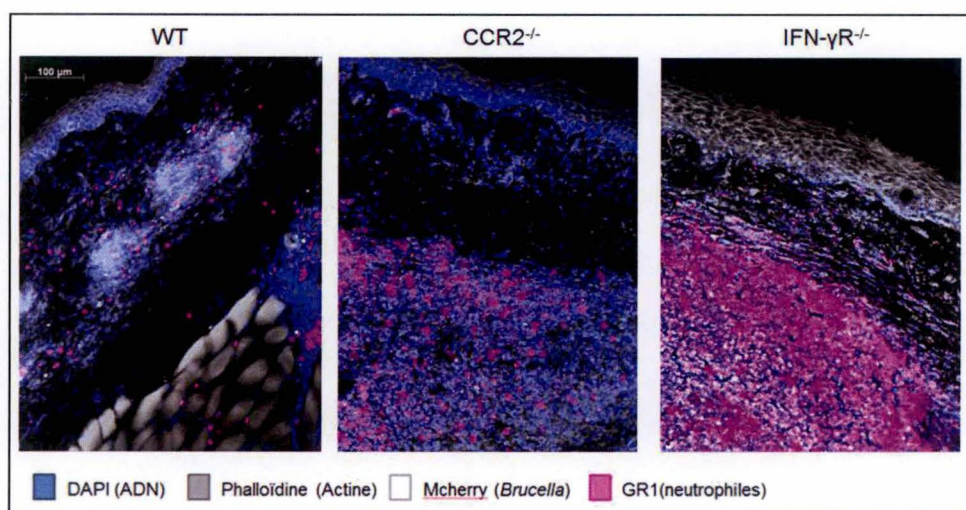


**Figure 28 – Recrutement de cellules MHCII<sup>+</sup> dans le derme de la patte de souris WT naïves et infectées à 3 et 7 jours.** La coloration DAPI Phallo MHCII permet d'identifier les monocytes recrutés lors de l'infection. Dans la souris naïve, les cellules de Langerhans (cellules dendritiques spécialisée de la peau) sont les principales cellules marquées. Le recrutement cellulaire dans le derme augment progressivement à 3 et 7 jours post-infection.

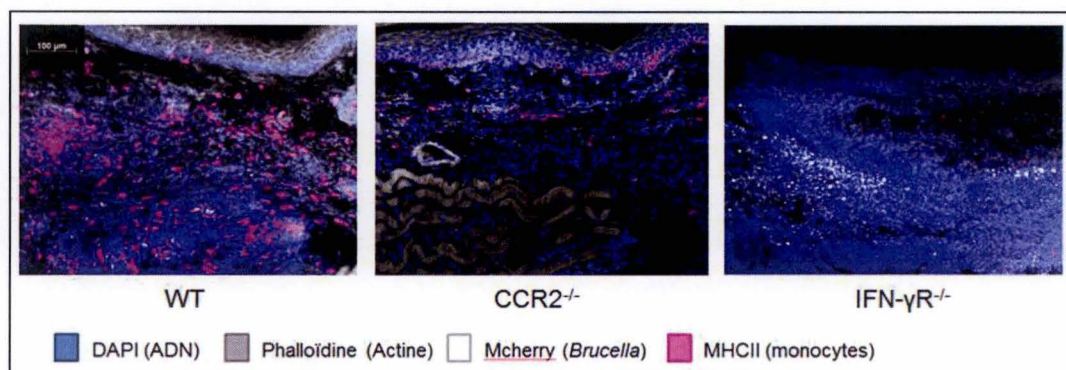




**Figure 29 – Zoom 63x des types cellulaires infectés ou non dans la patte de souris WT à 3 jours post-infection.** Les cellules GR1<sup>+</sup> ne sont pas infectées. Une partie des cellules MHCII<sup>+</sup> est infectée.



**Figure 30 – Variation du recrutement des cellules GR1<sup>+</sup> en fonction des souris déficientes à 3 jours post-infection.** L'analyse immunohistologique des pattes de souris déficientes IFN-γR démontre un recrutement massif de neutrophiles.



**Figure 31 – Variation du recrutement des cellules MHCII<sup>+</sup> en fonction des souris déficientes à 3 jours post-infection.** L'analyse immunohistologique des lésions démontre un recrutement de monocytes chez la souris CCR2<sup>-/-</sup>. Ce recrutement est absent chez la souris IFN-γR<sup>-/-</sup>.



Les souris déficientes pour CCR2 et IFN- $\gamma$ R présentent des recrutements cellulaires différents des WT. Comme illustré (figure 30), le nombre de cellules positives pour GR1 (neutrophiles) est plus élevé chez les souris déficientes que chez la souris WT à 3 jours post-infection. Ceci confirme les résultats obtenus lors de l'analyse cytométrique. Néanmoins, le recrutement des cellules GR1<sup>+</sup> diminue rapidement à 7 et 14 jours chez les souris CCR2 pour rejoindre une cinétique comparable à la souris WT (données non-montrées). Pour les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>, le recrutement est majoritairement constitué de cellules GR1<sup>+</sup> jusqu'à 14 jours après l'infection. Ces souris présentent déjà un recrutement impressionnant dans le derme à 3 jours post-infection (figure 30). Ce recrutement cellulaire est probablement la cause du gonflement de la lésion. A l'opposé des cellules GR1<sup>+</sup>, le recrutement de cellules MHCII<sup>+</sup> (monocytes) suit la tendance inverse (figure 31). Ces cellules MHCII<sup>+</sup> augmentent chez la souris WT et CCR2<sup>-/-</sup> au moment où le recrutement des cellules GR1<sup>+</sup> diminue. Alors que les MHCII<sup>+</sup> sont absents de la patte des souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>. Ces dernières sont déjà saturées de cellules GR1<sup>+</sup>.

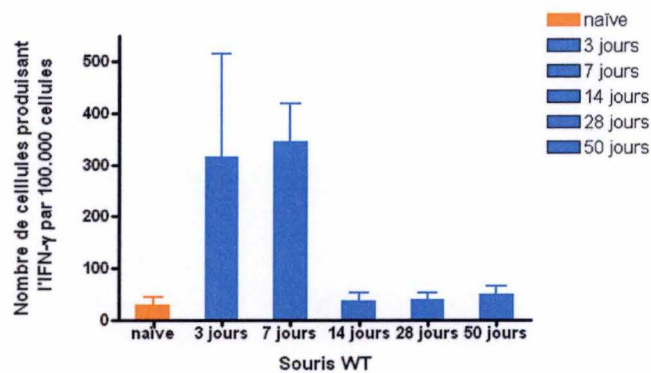
Après cette étude du recrutement de cellules myéloïdes dans la patte, nous nous sommes intéressés à la présence et/ou le recrutement de cellules lymphoïdes. L'analyse cytométrique des lésions indique également un recrutement de cellules CD3<sup>+</sup> chez les souris infectées comparées aux souris naïves. Le CD3 est un co-récepteur du récepteur antigénique exprimé par les lymphocytes T. Une coloration de surface CD3 CD8 CD4 a été utilisée pour phénotyper ces cellules (annexe1). Parmi les cellules CD3<sup>+</sup>, on retrouve 9% de CD4 et 12% de CD8 à 3 jours post-infection. Ce ratio tend à s'équilibrer à 7 jours. Les T CD4 semblent persister dans la patte jusqu'à 28 jours alors que les T CD8 diminuent rapidement (annexe 2). Cependant, la majorité des cellules CD3<sup>+</sup> présentes dans la patte naïve et infectée est CD8-CD4-. Ces cellules pourraient être des NKT ou des lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Une autre coloration de surface CD3  $\gamma\delta$  CD4 a démontré que seul 3-4% des cellules CD3<sup>+</sup> sont des lymphocytes T  $\gamma\delta$  (données non-montrées). Pour la majorité des cellules CD3<sup>+</sup> dans la patte, le phénotype reste indéterminé à ce stade.

La présence de lymphocytes a également été étudiée dans la lésion des souris déficientes pour IFN- $\gamma$ R et CCR2. Une coloration CD3  $\gamma\delta$  CD4 a permis de démontrer l'existence d'un recrutement des cellules CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Chez la souris CCR2<sup>-/-</sup>, une augmentation des T CD4 de 3% à 40% peut être observée en deux semaines parmi les cellules CD3<sup>+</sup>. Chez la souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>, cette augmentation est encore plus accentuée en passant de 4% à 50% en deux semaines. Dans les deux cas, le pourcentage de lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans la lésion ne varie pas au cours de l'infection (3-4%).

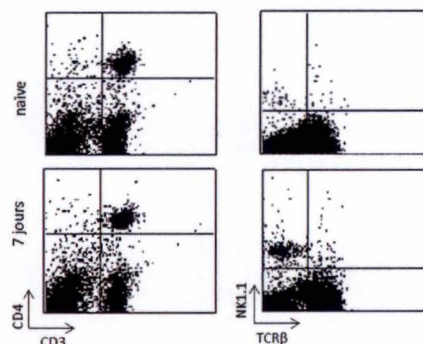
## **2. Analyse des cellules productrices d'IFN- $\gamma$ dans les ganglions lymphatiques**

Les souris déficientes pour la voie de signalisation de l'IFN- $\gamma$  présentent une forte lésion nécrotique. Ceci suggère qu'il s'agit d'une cytokine clé impliquée dans le contrôle de l'infection cutanée.

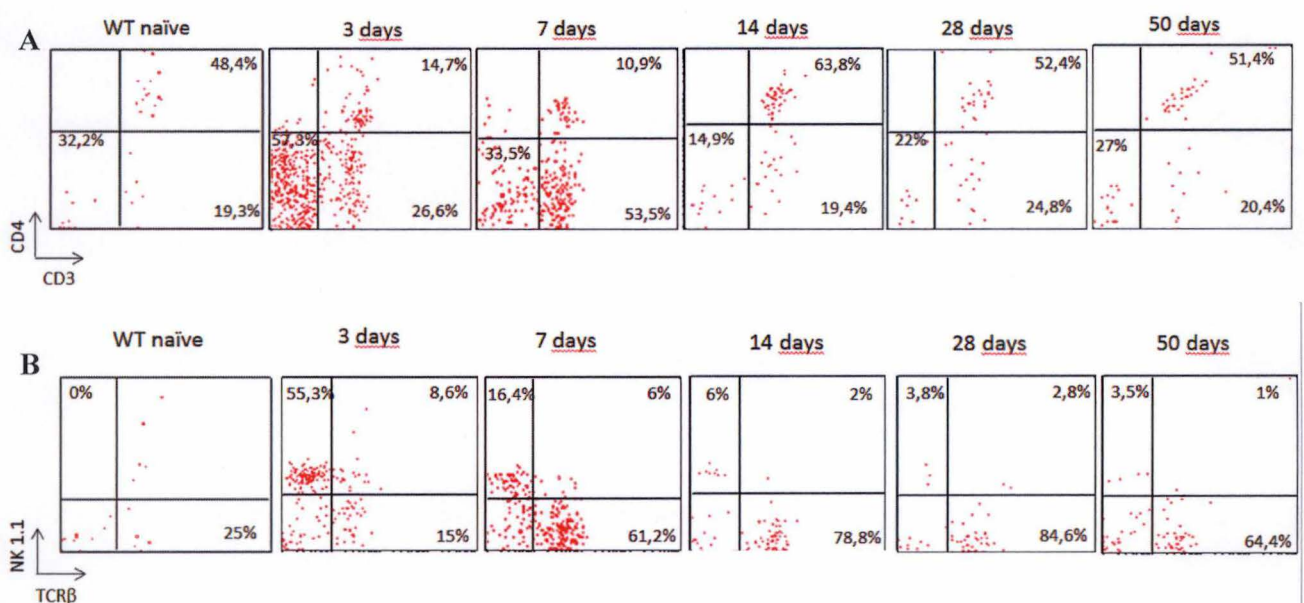




**Figure 32 – Cinétique de la production d'interféron- $\gamma$ .** Nombre de cellules productrices dans le ganglion poplité des souris WT naïves et infectées à différents temps (sur 100.000 cellules totales). Le pic est atteint à 7 jours post-infection.



**Figure 33 – Phénotype des cellules totales présentes dans les ganglions pour la souris WT.** L'analyse cytométrique a été réalisée avec les marquages CD3 CD4 et TCR NK1.1. Les cellules du ganglion naïf sont comparées avec cellules du ganglion infectées 7 jours (pic de production de l'IFN- $\gamma$ ).



**Figure 34 - Phénotypage des cellules produisant l'IFN- $\gamma$  dans le ganglion pour les souris WT de 3 à 50 jours avec les marquages CD3 CD4 et TCR NK1.1.** Le pourcentage correspond au pourcentage de cellules positives pour les marqueurs parmi les cellules IFN- $\gamma$  positives.

Comme l'activation des lymphocytes T a généralement lieu dans les ganglions lymphatiques, nous avons étudié les cellules productrices de l'IFN- $\gamma$  dans le ganglion poplité drainant la partie inférieure de la patte à différents temps post-infection.

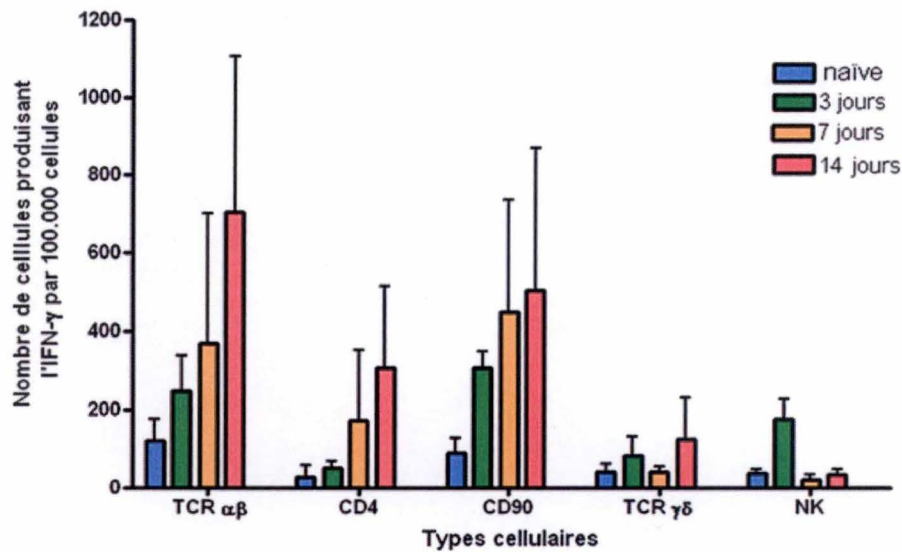
Comme illustré (figure 32), la production d'IFN- $\gamma$  augmente suite à l'infection des souris. Le pic de production est atteint à 7 jours post-infection pour les souris WT. Afin de phénotyper les cellules productrices d'IFN- $\gamma$ , deux marquages ont été réalisés en analyse cytométrique (figure 33). Le premier CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$  (figure 34A) est choisi sur base des données précédemment obtenues lors de l'étude d'infection de *Brucella* en intrapéritonéal (Copin, 2007) et en intranasal (Hanot-Mambres, non-soumis). A 3 et 7 jours post-infection, les cellules productrices sont majoritairement CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Afin de phénotyper d'avantage ces cellules, nous avons réalisé un marquage TCR NK1.1 IFN- $\gamma$  (figure 34B). Celui-ci montre que les cellules productrices à 3 et 7 jours sont des Natural Killers (NK). A 14, 28 et 50 jours post-infection, ce sont les lymphocytes T CD4 qui semblent prendre le relais pour produire l'IFN- $\gamma$ . Aux différents temps post-infection, on observe également une faible production des cellules NK1.1<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> (NKT) et des cellules CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (TCD8 ou T  $\gamma\delta$ ). La figure 35 reprend l'ensemble des cellules productrices d'IFN- $\gamma$ .

La figure 36 démontre l'impact des souris déficientes pour MHCII, TAP1 et CD3 sur la production d'IFN- $\gamma$  à différents temps post-infection. La souris MHCII<sup>-/-</sup> présente une production moindre que la WT, alors que les souris TAP-1<sup>-/-</sup> et CD3<sup>-/-</sup> ont une production plus élevée d'IFN- $\gamma$ , particulièrement les souris CD3<sup>-/-</sup>. Le phénotypage de ces cellules productrices est réalisé à 7 jours, au moment du pic de production de la WT (figure 37). Les souris déficientes pour CD3 ne disposent plus de lymphocytes T. Les principaux producteurs d'IFN- $\gamma$  pour ces souris sont les Natural Killers (TCR<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup>). Les souris déficientes pour MHCII ne disposent plus de lymphocytes T CD4, dès lors la production d'IFN- $\gamma$  est assurée par les NK. Et finalement, chez les souris déficientes pour TAP-1 qui ne présentent plus l'antigène aux lymphocytes T CD8, les cellules productrices d'IFN- $\gamma$  sont les NK et les T CD4, respectivement à 3 et 7 jours post-infection (figure 37).

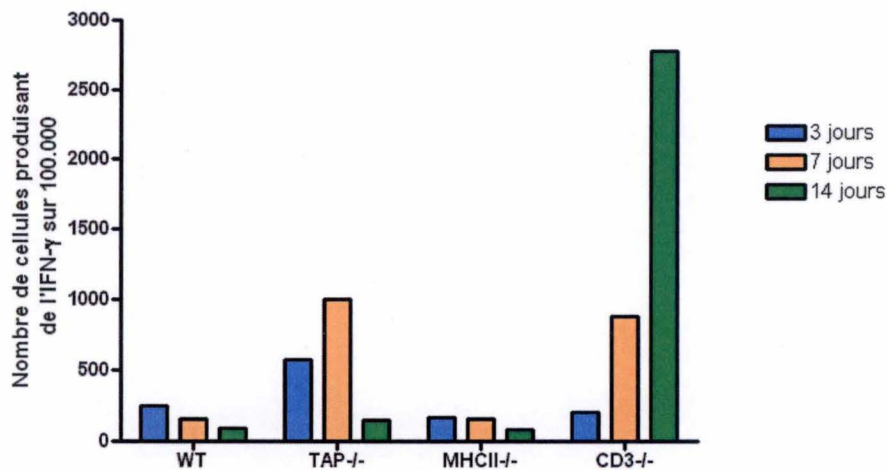
Ces données suggèrent que les T CD4 et les NK sont les principaux producteurs d'IFN- $\gamma$  dans le ganglion poplité. Les NK répondent précocement à l'infection, alors que les T CD4 produisent plus tardivement.

La production d'IFN- $\gamma$  a également été étudiée au niveau de la lésion des souris infectées. Comme décrit précédemment, il y a très peu de lymphocytes TCD4<sup>+</sup> ou TCD8<sup>+</sup> recrutées dans le coussinet plantaire de souris WT infectée (annexe 1 et 2). La production d'IFN- $\gamma$  est donc également très faible (annexe 3). Pour la souris WT naïve, 27 cellules sur 20.000 cellules présentes dans la lésion sont productrices d'IFN- $\gamma$ . Lors du pic de production, 80 cellules sur 20.000 sont productrices. Parmi celles-ci, on retrouve des cellules lymphoïdes positives pour CD90<sup>+</sup> et des cellules non-lymphoïdes négatives pour CD90<sup>-</sup> (annexe 4). A 1 jour post-infection, les principaux producteurs sont les CD90<sup>-</sup>. A 3 jours, ce sont les cellules CD90<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Celles-ci peuvent être des NK, des T  $\gamma\delta$ , des T CD8 ou des NKT. A 7 jours, on observe l'arrivée des T CD4 (CD90<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) produisant l'IFN- $\gamma$ .

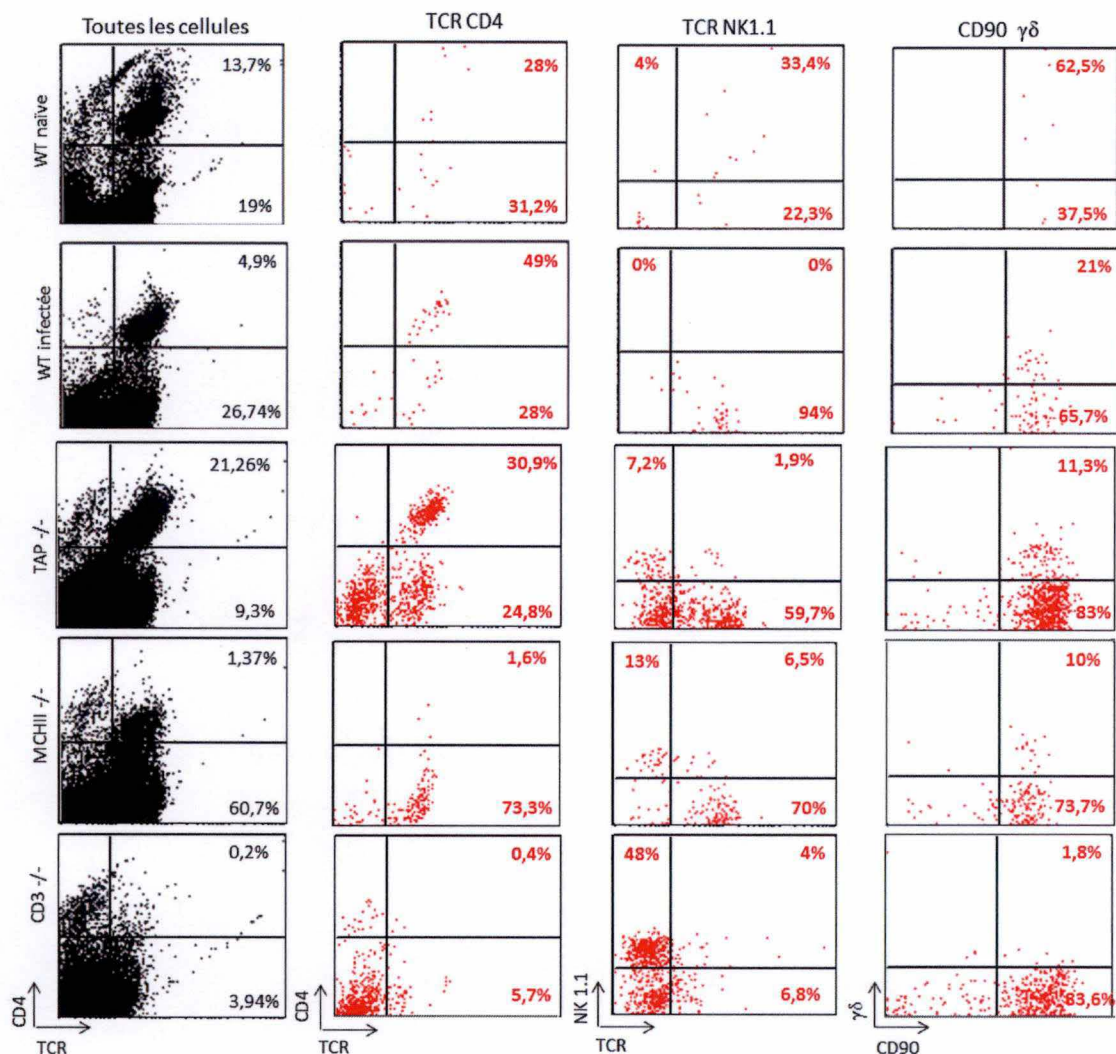




**Figure 35 – Principales cellules productrices d'IFN- $\gamma$  pour les souris WT à 3 jours.** Les cellules portant le TCR $\alpha\beta$  (lymphocytes T) et le CD90 (lymphocytes et NK) sont les principaux producteurs. Les T  $\gamma\delta$  produisent plus faiblement l'interféron.



**Figure 36 – Variation du nombre de cellules productrices d'interféron- $\gamma$  dans le ganglion poplité selon les souris déficientes (sur 100.000 cellules totales).** Les souris WT et MHCII<sup>-/-</sup> présentent la même cinétique. Le pic de production pour la souris TAP<sup>-/-</sup> est atteint à 7 jours post-infection. La production la plus importante est atteinte à 14 jours chez la souris CD3<sup>-/-</sup>.



**Figure 37 – Phénotypage des cellules productrices d'IFN- $\gamma$  dans le ganglion poplité des souris WT et déficientes pour IFN- $\gamma$ R et CCR2.** Les cellules recrutées sont positives pour CD11b (marqueur de cellules myéloïdes). Les souris déficientes pour TAP-1 ne présentent plus aux lymphocytes T CD8. Les cellules productrices d'IFN- $\gamma$  sont les NK et les T CD4, respectivement à 3 et 7 jours post-infection. Les souris déficientes pour MHCII ne présentent plus aux lymphocytes T CD4, dès lors la production d'INF- $\gamma$  est assurée par les NK. Pour les souris CD3-/- qui ne présentent plus les lymphocytes T, les producteurs d'IFN- $\gamma$  sont les Natural Killers (NK).



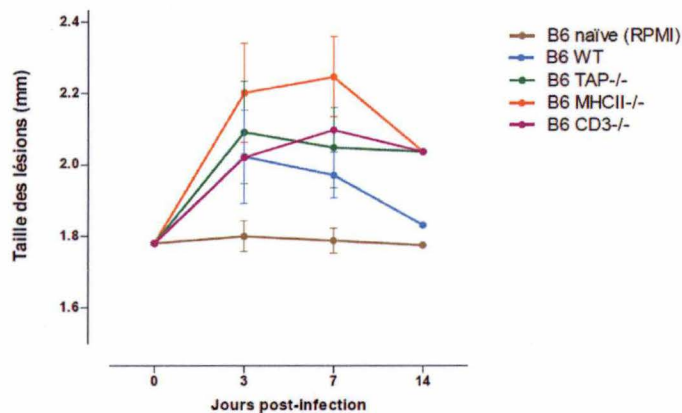


Figure 38 – Variation de la taille des lésions des souris WT, TAP<sup>-/-</sup>, MHCII<sup>-/-</sup> et CD3<sup>-/-</sup>. L'épaisseur moyenne des pattes de souris varie entre 1,7 et 1,8 mm. L'épaisseur des pattes des souris déficientes restent proche de celles de la WT. Toutefois, aucune ne retrouve une taille normale après 2 semaines d'infection.

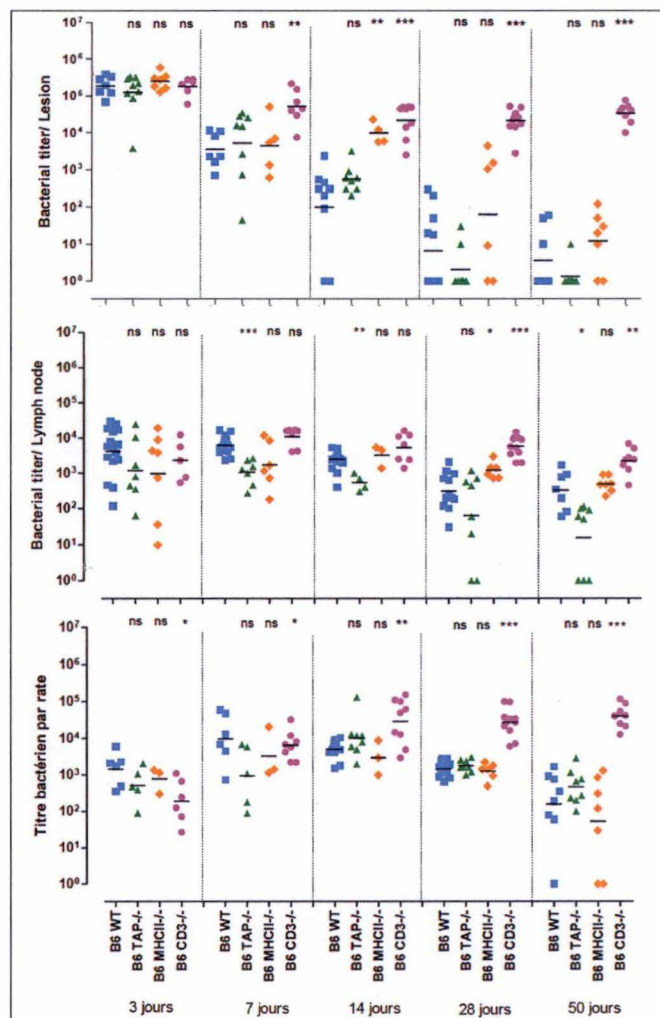


Figure 39 – Variation de la charge bactérienne dans la patte, le ganglion poplitée et la rate de souris WT, TAP<sup>-/-</sup>, MHCII<sup>-/-</sup> et CD3<sup>-/-</sup>. Toutes les souris déficientes suivent la même cinétique que la souris WT, excepté la CD3<sup>-/-</sup> où le titre bactérie augmente de manière significative par rapport à la WT.

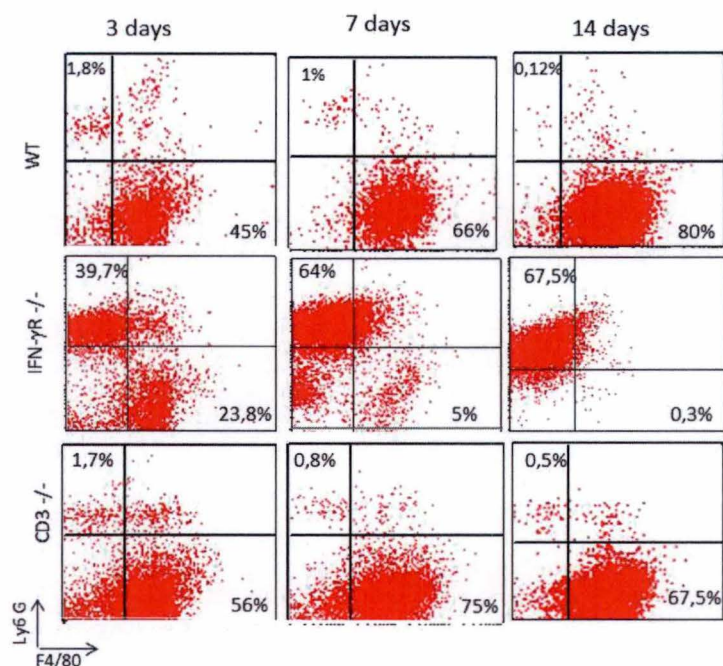
Les souris déficientes pour TAP<sup>-/-</sup>, MHCII<sup>-/-</sup> et CD3<sup>-/-</sup> ont également été suivies au niveau de la taille de la lésion et des charges bactériennes.

Le gonflement inflammatoire au niveau du coussinet plantaire (taille de la lésion) pour les souris déficientes reste proche de celle de la souris WT (figure 38). Aucune des souris déficientes ne présentent de nécrose. Néanmoins, elles ne retrouvent pas non plus une taille normale deux semaines après l'infection. Les charges bactériennes dans les organes des souris déficientes pour TAP<sup>-/-</sup> et MHCII<sup>-/-</sup> ne présentent pas de différence significative avec les charges observées chez les souris WT (figure 39). Seules les souris CD3<sup>-/-</sup> semblent ne pas contrôler les charges bactériennes dans les différents organes. A 50 jours post-infection, la différence est hautement significative comparée à la WT.

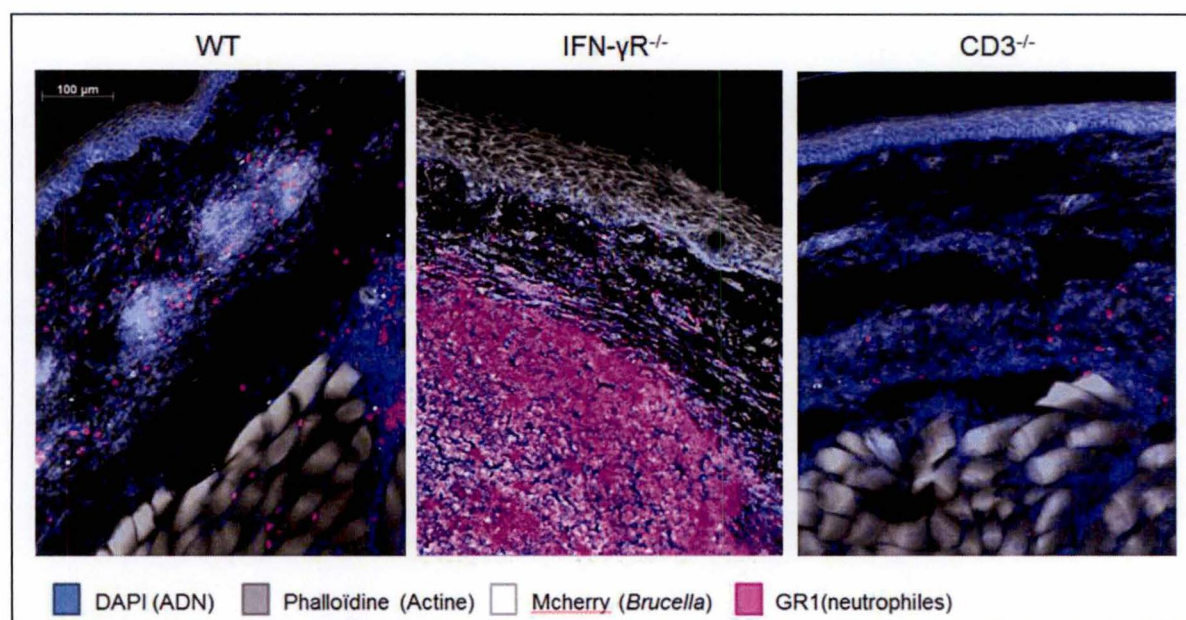
Le recrutement de cellules myéloïdes au niveau de la lésion a également été réalisé pour les souris déficientes TAP, MHCII et CD3 (données non-montrées). Ce recrutement est comparable au celui observé pour le souris WT, à savoir une majorité de monocytes. Le recrutement de cellules lymphoïdes a également été étudié chez ces souris (données non montrées). Cette analyse a surtout permis de confirmer le phénotype mutant des souris. Les souris TAP<sup>-/-</sup> présentent une déficience pour les TCD8. Les souris MHCII<sup>-/-</sup> présentent une déficience pour TCD4<sup>+</sup> et les souris CD3<sup>-/-</sup> ne présentent aucuns lymphocytes T.

Le phénotype des souris CD3<sup>-/-</sup> est très intéressant. Ces souris présentent des charges bactériennes importantes (équivalentes à celles des souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) mais ne développent aucune lésion nécrotique. Des analyses cytométriques ont été réalisées pour la lésion des CD3<sup>-/-</sup> dans le but d'étudier les recrutements cellulaires dans la patte au cours de l'infection (figure 40). La coloration CD11b Ly6G F4/80 indique que les souris CD3<sup>-/-</sup> présente les mêmes recrutements cellulaires myéloïdes que la souris WT, c'est-à-dire majoritairement des monocytes (F4/80<sup>+</sup>), aux différents temps post-infection. Alors que le recrutement pour la souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> est constitué de neutrophiles (Ly6G<sup>+</sup>) (figure 40). Ces résultats sont confirmés par analyse immunohistologique (figure 41). A 3 jours, les pattes des souris WT et CD3<sup>-/-</sup> présentent peu de neutrophiles (GR1<sup>+</sup>). A l'opposé, les pattes de souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> présentent une majorité de cellules GR1<sup>+</sup> (neutrophiles).

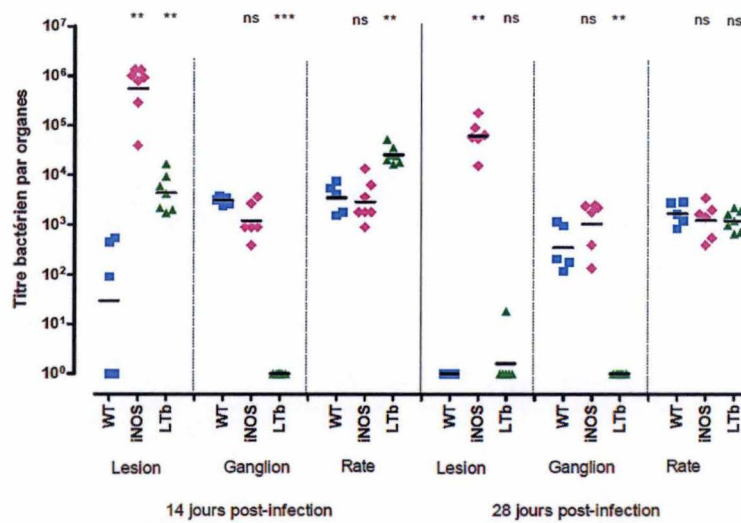




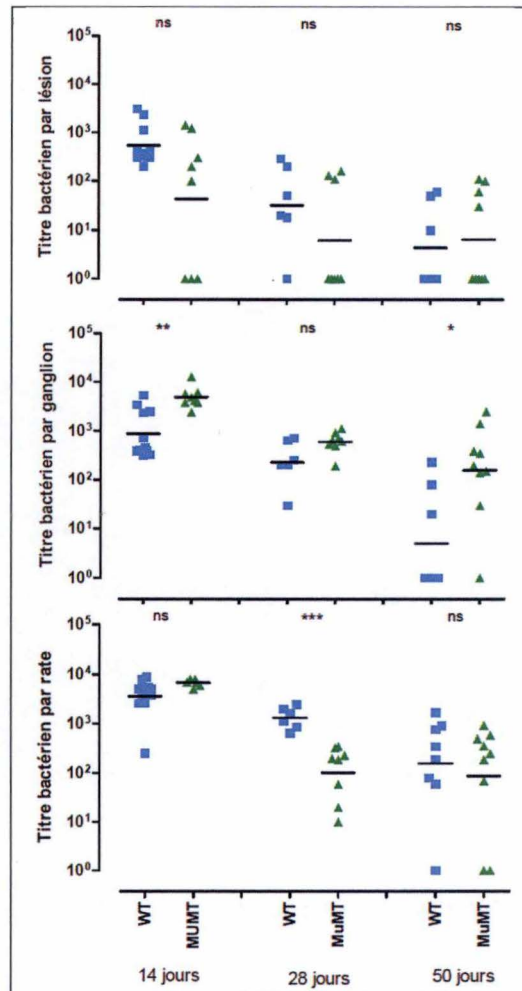
**Figure 40 – Phénotypage des cellules myéloïdes CD11b<sup>+</sup> dans la patte des souris WT et déficientes pour IFN-γR et CD3.** Le recrutement observé pour les CD3<sup>-/-</sup> est similaire aux WT, à savoir des CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> F4/80<sup>+</sup> (monocytes). Le recrutement cellulaire observé pour IFN-γR<sup>-/-</sup> est principalement composé de neutrophiles (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>).



**Figure 41 – Visualisation du recrutement des neutrophiles.** A 3 jours post-infection dans la patte des souris WT et déficientes pour IFN-γR et CD3, le recrutement des cellules GR1<sup>+</sup> varie. La souris IFN-γR<sup>-/-</sup> présente un recrutement important de neutrophiles. Ce recrutement n'est pas observé pour les souris WT et CD3<sup>-/-</sup>.



**Figure 42 - Titre bactérien dans les souris sauvages et déficientes pour l'iNOS et pour LT $\beta$  dans les différents organes (lésion, ganglion, rate) à 14 et 28 jours post-infection.**



**Figure 43 - Figure reprenant le titre bactérien dans les souris WT et MuMT $^{-/-}$  dans les différents organes (lésion, ganglion, rate) à 14, 28 et 50 jours post-infection.**



### 3. Etudes préliminaires

#### 3.1 Le rôle de l'iNOS<sup>-/-</sup> dans le contrôle de l'infection

Dans le modèle d'infection intrapéritonéal de *Brucella*, l'IFN- $\gamma$  et l'iNOS sont tous deux essentiels dans le contrôle de l'infection (Copin et al., 2007). Dans le modèle cutané, nous observons que le titre bactérien dans la lésion est significativement plus élevé chez la souris iNOS<sup>-/-</sup> que chez la souris WT à 14 et 28 jours post-infection (figure 42). Ces résultats pourraient suggérer une importance de l'iNOS dans le contrôle de l'infection. Cependant, cette différence n'est significative que dans la lésion cutanée. Il n'y a pas de différence dans le ganglion et la rate. Cette manipulation n'a pu être répétée. Dès lors, aucune conclusion définitive ne peut donc être tirée à ce stade.

#### 3.2 Influence du ganglion drainant dans le contrôle de l'infection cutanée

Le ganglion poplité a été étudié dans le but de comprendre sa fonction au cours de l'infection par *Brucella melitensis*. Le ganglion est, en effet, le lieu d'activation des lymphocytes. Des souris déficientes pour la lymphotoxine  $\beta$ , qui présentent une structure altérée des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatique et rate) ont été utilisées. Le titre bactérien dans le ganglion est en-dessous de 10 bactéries, le seuil de détection (figure 42). Les charges bactériennes dans la lésion et la rate sont significativement plus élevées à 14 jours post-infection, dans les souris LT $\beta$ <sup>-/-</sup> comparé aux souris WT. Cette différence disparaît à 28 jours dans les deux organes, ce qui suggère que l'absence de ganglions ne se traduirait pas par une incapacité à contrôler la bactérie dans la lésion. De nouveau, cette manipulation n'a pas été répétée.

#### 3.3 Implication des lymphocytes B dans le contrôle de l'infection

Afin d'étudier l'action des anticorps et des lymphocytes B, des souris MuMT ont été utilisées. Ces souris sont déficientes pour la chaîne  $\mu$  de l'immunoglobuline et sont donc déficientes pour les lymphocytes B (Kitamura et al., 1991). Le titre bactérien pour les souris MuMT a été comparé au titre bactérien des souris WT (figure 43). Globalement, aucune différence n'est statistiquement significative dans les organes étudiés. Il n'y aurait pas d'effet des lymphocytes B dans le contrôle de la bactérie. Au contraire, les souris déficientes pour les lymphocytes B tendent à mieux contrôler l'infection. Deux exceptions sont cependant observées : le ganglion à 50 jours et la rate à 28 jours. De nouveau, cette manipulation n'a pas été répétée et aucune conclusion définitive ne peut être tirée à ce stade.

## **Discussion, conclusions & perspectives**

---



## Discussion

### 1. Comparaison des différents modèles d'infection par *Brucella melitensis* chez la souris

Plusieurs études cliniques ont montré le développement de brucellose suite à un contact direct entre la bactérie et la peau abrasée. Nous avons donc développé un modèle d'infection du coussinet plantaire de la souris par *Brucella melitensis*. Dans ce modèle, nous avons tenté d'identifier les facteurs participant au contrôle de l'infection par *Brucella* ainsi que ceux contribuant au développement d'une lésion cutanée. Nous avons également tenté de caractériser les principales cellules infectées par *Brucella* dans la peau.

#### Identification des cellules infectées par *Brucella* dans le modèle cutané

Un des objectifs de ce modèle est d'identifier le type cellulaire infecté dans la lésion et de les comparer aux autres modèles d'infection. Aux premières heures de l'infection, aucune cellule ne semble infectée. La bactérie est probablement extracellulaire dans un premier temps avant de devenir intracellulaire. L'étude des modèles d'infection intrapéritonéal (IP) et intranasal (IN) réalisé précédemment a montré que les premières cellules infectées étaient des cellules phagocytaires de type myéloïde. Par exemple, dans la rate (*Copin et al, 2007*), les macrophages de la zone marginale (macrophages métallophiliques) et les macrophages de la pulpe rouge sont les premières cellules infectées. Dans l'infection intranasale, les cellules infectées dans le poumon sont les macrophages alvéolaires à 24 heures post-infection (*Archambaux et al., 2010*). Il semblerait que certains neutrophiles soient aussi infectés dans le poumon (*Hanot-Mambres, non-publié*). C'est un résultat préliminaire, il est nécessaire de confirmer l'infection des neutrophiles dans le poumon.

Dans notre modèle d'infection cutané, les neutrophiles recrutés (marquage GR1) ne semblent pas être infecté par *Brucella*. Une faible proportion des cellules infectées dans les souris WT expriment le MHC-II. Ce marqueur est exprimé par certaines sous-populations de monocytes recrutés, ce qui suggérerait que les monocytes seraient parmi les premières cellules infectées par *Brucella* dans la lésion. L'ensemble de ces résultats exclut les neutrophiles comme cellules hôtes pour le modèle d'infection cutané, mais ne permet pas de déterminer un rôle pour les monocytes. L'analyse de cellules infectées *in situ* doit être poursuivie avec des marqueurs spécifiques des monocytes tels que CD11b, F4/80 et Ly-6C. Une quantification précise de l'expression des différents marqueurs sur les cellules infectées doit également être réalisée. De plus, les co-localisations observées entre les bactéries et les cellules ne correspondent pas forcément à une infection. Une « simple » superposition des marquages ne peut pas être exclue. Une étude en microscopie confocale permettrait de déterminer si les bactéries se trouvent bien au sein des cellules.

## Caractérisation de la réponse immunitaire contre *Brucella* dans le modèle cutané

La réponse immunitaire contre les pathogènes intracellulaires est généralement une réponse  $T_H1$ . Le modèle IP d'infection par *Brucella* a bien démontré l'implication de la réponse  $T_H1$  dans le contrôle de la bactérie (Copin et al., 2007). Cependant, dans le modèle d'infection intranasal, la réponse  $T_H1$  peut présenter une synergie avec la réponse  $T_H17$  (Hanot-Mambres, non-publié). Les cellules  $T_H17$  produisent notamment l'IL-17 qui est impliquée dans le recrutement et l'activation des neutrophiles. La réponse  $T_H17$  est normalement efficace contre les pathogènes extracellulaires, mais peut aussi médier des pathologies immunitaires sévères (Korn, 2009). Pour le modèle d'infection cutanée en patte, la réponse de type  $T_H17$  n'a pas été étudiée mais fait partie des perspectives importantes.

Chez les souris WT, le premier recrutement cellulaire est composé de neutrophiles (10 minutes et 2 heures post-infection). Celui-ci laisse place à un recrutement de monocytes à long terme (de 3 à 50 jours après l'infection). Le recrutement des monocytes est corrélé à la chute du titre bactérien et à un retour de l'aspect normal de la patte. L'étude des souris génétiquement déficientes pour CCR2 et IFN- $\gamma$ R confirme le rôle des monocytes dans l'élimination de *Brucella*. Les souris CCR2<sup>-/-</sup> présentent un retard dans le recrutement des monocytes et donc dans le contrôle de l'infection. Chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>, le recrutement, majoritairement composé de neutrophiles, induit une forte augmentation de la taille de la lésion et le développement de nécrose.

Il a été démontré dans d'autres modèles d'infection qu'en absence d'IFN- $\gamma$ , l'hématopoïèse pouvait être altérée (MacNamara et al., 2011). En effet, une étude a montré que des souris C57BL/6 WT infectées par *Ehrlichia muris*, une bactérie intracellulaire obligatoire transmissible par les tiques (MacNamara et al., 2011), présentent un important recrutement de monocytes. Lorsque l'infection est réalisée chez des souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$ , les cellules recrutées sont principalement des neutrophiles. L'étude conclut qu'en absence de la voie signalisation fonctionnelle de l'IFN- $\gamma$ , les précurseurs myéloïdes sont différenciés en neutrophiles au lieu de monocytes. Il s'agit de la première étude démontrant une capacité de l'IFN- $\gamma$  à jouer les modulateurs de l'hématopoïèse. Les mécanismes détaillés restent inconnus. Avant cette étude, il existe un paradigme historique remontant aux années 1980 qui démontrait que l'interféron supprimait l'hématopoïèse dans des modèles de culture *in vitro* (Broxmeyer et al., 1983 ; Toretsky et al., 1986). Au vu des nouvelles découvertes, ces anciens résultats peuvent être remis en question.

Les neutrophiles sont bien connus pour détruire les cellules infectées de manière très aspécifique en sécrétant le contenu de leurs granules, ce qui induit généralement des dommages importants aux tissus environnants. La dégranulation des neutrophiles est source d'inflammation et induit de nouveaux recrutements cellulaires. Cette boucle destruction/inflammation/recrutement peut conduire localement à une importante nécrose.



Dans le modèle intranasal, des résultats similaires ont été obtenus au niveau pulmonaire (*Hanot-Mambres, non-publié*). Comme dans notre modèle d'infection cutané, des neutrophiles sont massivement recrutés dans le poumon des souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>, ce qui induit une importante destruction des alvéoles pulmonaires et la mort de l'animal après trois semaines d'infection. L'ensemble de toutes ces données suggèrent fortement un rôle essentiel des monocytes dans le contrôle de l'infection cutanée par *Brucella*. Les neutrophiles sont impliqués dans le développement de lésion nécrotique en absence d'IFN- $\gamma$ .

Différentes études ont déjà documenté le rôle crucial de l'interféron- $\gamma$  dans le contrôle des infections par *Brucella*. Dans les années 90, des études *in vitro* avaient déjà suggéré que l'IFN- $\gamma$  améliore la résistance des cellules à l'infection de *Brucella* par l'activation des macrophages, principalement en augmentant la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (*Jiang et al., 1993*). Il a aussi été démontré dans une étude *in vivo* que la déplétion de l'interféron- $\gamma$  par l'administration d'anticorps monoclonal augmente de 10 fois le nombre de bactéries (*Brucella abortus*) dans la rate et le foie après la première semaine d'infection de souris (*Zhan et al., 1993*). En 2001, l'infection des souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> ( $5 \times 10^3$  CFU de *Brucella abortus*) a démontré leur incapacité totale à contrôler l'infection (*Murphy et al., 2001*). Dans leur modèle, la charge bactérienne dans la rate augmentait continuellement jusqu'à la mort de la souris (6 semaines post-infection).

Plus récemment, en 2007, l'étude de Copin sur l'infection IP des souris avec *Brucella melitensis* a identifié les principales cellules productrices d'IFN- $\gamma$  dans la rate des souris infectées. Dans cet organe, la fréquence de cellules produisant l'IFN- $\gamma$  atteint un plateau entre 5 et 15 jours après l'infection. A 5 jours post-infection, la production est assurée par les NK (38 %), les TCD4 (21%) et les TCD8 (19%). A 10 jours post-infection, la majorité de la production provient des T CD4 (74%). L'étude de Vitry (*Vitry et al, 2012*) a démontré l'importance des lymphocytes T CD4 par rapport aux lymphocytes T CD8 ou aux lymphocytes B dans le contrôle de l'infection par *Brucella*.

Nos données concernant les sources d'IFN- $\gamma$  pour l'infection cutanée concordent avec le modèle IP. Dans notre modèle, le pic de production est atteint à 7 jours. Les types cellulaires produisant l'interféron varient également au cours de l'infection. A 3 jours post-infection, parmi les producteurs d'IFN- $\gamma$ , on retrouve en moyenne 57% de NK et 15 % de T CD4. A 7 jours post-infection, on retrouve 16,5% de NK pour 62% de lymphocytes T. Aux temps tardifs (14, 28 et 50 jours), 80% de la production provient des lymphocytes T CD4.

On peut en conclure donc que les NK répondent précocement à l'infection, alors que les lymphocytes T CD4 produisent plus tardivement. Il y a aussi une faible production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes non-conventionnels, à savoir les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et les NKT chez toutes les souris étudiées. Lorsque les souris sont déficientes pour un des types cellulaires cités ci-dessus, le relais de la production est repris par l'autre type cellulaire présent. C'est particulièrement le cas des souris déficientes pour CD3 (ne disposant pas de lymphocytes T), les NK produisent de grande quantité d'IFN- $\gamma$ .



Le modèle d'infection IP (*Copin et al., 2007*) a également permis de démontrer que l'iNOS joue un rôle équivalent à l'IFN- $\gamma$  dans le contrôle de l'infection par *Brucella*. En effet, cinq jours après l'infection, il y a 10 fois plus de bactéries dans la rate des souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$  et pour l'iNOS par rapport aux souris WT (*Copin et al., 2007*). L'IFN- $\gamma$  est connu pour réguler la production d'iNOS dans différents modèles d'infections bactériens (*MacMicking et al., 1997 ; Chakravorty et al., 2003*). En IP, l'IFN- $\gamma$  régule positivement l'enzyme iNOS dans la cavité péritonéale et la rate. Les souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$  présentent une activité de l'iNOS réduite de 10 fois.

Les résultats préliminaires obtenus dans le modèle d'infection cutanée sont moins clairs. Dans la patte, le titre bactérien est significativement plus élevé chez la souris iNOS<sup>-/-</sup> que chez la souris WT. Et les souris déficientes pour l'iNOS semblent moins bien contrôler l'infection. Mais, cette différence n'est significative que dans la lésion. Pour les autres organes étudiés (ganglion et rate), les différences ne sont pas significatives. Cette manipulation n'a cependant pas été répétée, faute de temps. En plus de reproduire ce dernier résultat, il serait également intéressant de quantifier la production d'iNOS dans la patte et d'identifier les cellules productrices de l'iNOS afin de pouvoir comparer ces données à celles obtenues pour l'IFN- $\gamma$ .

Après avoir étudié l'implication des cellules myéloïdes et des lymphocytes T dans le contrôle de l'infection, nous nous sommes intéressés à l'impact des lymphocytes B sur le contrôle de l'infection. Aucune différence n'est statistiquement significative comparée à la WT. Il n'y aurait pas d'effet des lymphocytes B dans le contrôle de la bactérie pour la lésion cutanée. Au contraire, les souris déficientes pour les lymphocytes B tendent à mieux contrôler l'infection. Cependant, pour le ganglion lymphatique et la rate, deux points sont significativement différents de la WT, respectivement à 28 et 50 jours post infection. De nouveau, cette manipulation n'a été effectuée qu'une seule fois et aucune explication ne peut en être tirée.

### **L'IFN- $\gamma$ n'est pas le seul facteur requis pour assurer le contrôle de l'infection cutanée par *Brucella***

Un résultat très intéressant est la différence entre la souris CD3<sup>-/-</sup> et la souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>. Comme mentionné précédemment, toutes deux présentent une charge bactérienne importante, mais un aspect de la lésion et des recrutements cellulaires très différents. Alors que l'IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> présente un gonflement important et une lésion nécrotique, la CD3<sup>-/-</sup> présente un « faible » gonflement et aucune nécrose. De même, le recrutement cellulaire dans la lésion pour les souris CD3<sup>-/-</sup> est composé de monocytes alors que pour les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> ce sont des neutrophiles. Ce résultat peut être expliqué par la production importante d'IFN- $\gamma$  par les NK permettant d'induire la différenciation et l'activation des monocytes. Le modèle intranasale avait déjà démontré ces résultats pour la souris CD3<sup>-/-</sup> et l'importance de la production d'IFN- $\gamma$  par les NK (*Hanot-Mambres, non-publié*). Ce résultat suggère également qu'une production importante d'IFN- $\gamma$  en absence de lymphocytes ne permet pas un contrôle de la croissance bactérienne. Ceci implique que certaines populations de lymphocytes produiraient d'autres facteurs indispensables à ce contrôle et qui ne seraient pas produits par les NK. L'identification de ces facteurs et des cellules qui les produisent permettrait une meilleure compréhension de la réponse immunitaire contre *Brucella*.



## 2. Comparaison avec le modèle d'infection *Leishmania*

Pour développer le modèle d'infection cutanée par *Brucella*, nous nous sommes basé, comme référence, sur un modèle d'infection par le parasite intracellulaire *Leishmania major*. Ces deux modèles d'infections en patte présentent des similarités au niveau de la réponse immunitaire.

Les souris C57B/6 WT sont résistantes à l'infection par *Leishmania*. L'infection de ces souris conduit à une faible parasitémie et une pathologie cutanée modérée (Nylen et al., 2012). Les pattes présentent un léger gonflement similaire à celui observé pour l'infection de *Brucella* et la lésion cutanée est résolue spontanément. Comme pour notre modèle *Brucella*, les souris WT développent une réponse  $T_H1$  médiée par l'IFN- $\gamma$  permettant de contrôler l'infection de *Leishmania* et de résoudre la lésion cutanée (Gumy et al., 2004). Les souris ne développant pas ou faiblement de réponse  $T_H1$  (souris C57BL/6 déficientes ou souris BALB/C) sont fortement susceptibles à l'infection cutanée par *Leishmania*. Celles-ci présentent une parasitémie élevée et une importante nécrose cutanée. Chez ces souris susceptibles, les neutrophiles recrutés en masse au site d'infection sont impliqués dans la destruction des tissus, ce qui forme un ulcère cutané (Nylen, 2012). Cette fonction « destructrice » des neutrophiles correspond aux données observées dans le modèle d'infection cutané par *Brucella*.

Concernant le type cellulaire infecté dans la lésion, il a récemment été démontré que *Leishmania* est rapidement internalisée par les neutrophiles (Peters et al., 2008). Les neutrophiles sont les cellules effectrices primaires de la peau dont la principale fonction est la phagocytose et la destruction des pathogènes. Cependant, l'infection des neutrophiles n'est que transitoire (Peters et al., 2008 ; Nylen et al., 2010). Les hôtes définitifs des parasites sont les monocytes et les macrophages (Laskay et al., 2008 ; Peters et al., 2008 ; Nylen et al., 2010). Deux équipes proposent un modèle dans lequel les neutrophiles agiraient comme des « chevaux de Troie » pour *Leishmania* (Laskay et al., 2008 ; van Zandbergen et al., 2004). Un programme d'apoptose serait induit dans les neutrophiles infectés. La phagocytose de ces derniers par les monocytes permettrait à *Leishmania* de pénétrer dans les monocytes sans les activer. Dans notre modèle *Brucella*, aucun neutrophile ne semble infecté, ce qui suggère que les monocytes recrutés durant l'infection pourraient être directement infectés par *Brucella*.

L'immunité cellulaire joue un rôle important dans le contrôle de l'infection contre *Leishmania* et *Brucella*. Dans les deux modèles, les infiltrats cellulaires de la lésion des souris C57BL/6 WT sont composés de lymphocytes  $T\alpha\beta$  (TCD4/TCD8), des  $T\gamma\delta$ , des macrophages et un nombre plus faible de lymphocytes B, de NK et de granulocytes (Esterre et al., 1992). Pour la leishmaniose cutanée, les lymphocytes T semblent jouer un rôle central. Le modèle *Leishmania* a permis de mettre en lien le développement d'une réponse protectrice avec l'expansion de lymphocytes T CD4  $T_H1$  chez des souris C57BL/6 (Gumy et al., 2004). A la fois les T CD4 et les T CD 8 sont retrouvés dans la lésion cutanée.

Dans la peau saine, la majorité des cellules lymphoïdes sont positives pour le marqueur  $\alpha\beta$ . Dans l'infection par *Leishmania*, on observe une augmentation de 20 à 30% des lymphocytes positifs pour  $\gamma\delta$  (Nylen *et al.*, 2012). Pour l'infection par *Brucella*, nous n'avons pas pu déterminer avec certitude le phénotype des lymphocytes présents dans la patte, mais leur pourcentage était très faible.

La réponse immunitaire  $T_H1$  contre les pathogènes intracellulaires est médiée par l'IFN- $\gamma$ . Dans les souris WT infectées par *Leishmania*, la production d'IFN- $\gamma$  augmente rapidement au cours de l'infection. Les souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$  perdent complètement le contrôle de l'infection (Gumy *et al.*, 2004) et développent une forte lésion cutanée. L'IFN- $\gamma$  est la cytokine clé dans la réponse  $T_H1$  contre les pathogènes intracellulaires. Les NK sont les principales cellules productrices d'IFN- $\gamma$  dans les phases précoces de l'infection cutanée par *Leishmania* (Nylen *et al.*, 2010) Ils laissent rapidement place aux lymphocytes T CD4 et TCD8 pour la production en phase tardive (Nylen *et al.*, 2010). Ces données correspondent à celles obtenues pour *Brucella*. En effet, les NK ont la capacité de contrôler l'infection en produisant rapidement l'IFN- $\gamma$ . Alors que les lymphocytes T participent au contrôle de l'infection tardive.



## Conclusions

Le but de ce mémoire était de comparer le modèle d'infection cutanée avec les précédents modèles IP et IN. Nous avons essayé de déterminer si la voie d'infection affecte le type de cellule infecté préférentiellement par *Brucella*, ainsi que le type de réponse immunitaire protectrice.

Les données récoltées suggèrent un rôle essentiel des monocytes dans le contrôle de l'infection cutanée par *Brucella*. Le recrutement des monocytes observé suite à l'injection des bactéries apparaît partiellement dépendant du récepteur à chemokine CCR2. En son absence, le recrutement de monocytes est retardé de plusieurs jours. Nous avons également observé que la différenciation des monocytes et leur activation est fortement dépendante de l'IFN- $\gamma$ . En absence de sa voie de signalisation (souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>), le recrutement cellulaire se compose majoritairement de neutrophiles. L'infection n'est alors pas contrôlée et une nécrose importante se développe.

Nos données en cytométrie de flux suggèrent que les NK et les lymphocytes T CD4 et CD8 seraient les principaux producteurs d'IFN- $\gamma$  dans le ganglion drainant la lésion. Dans ce dernier, une étude préliminaire suggère la présence d'un petit nombre de cellules lymphoïdes ou non-lymphoïdes productrices d'IFN- $\gamma$ .

A la différence des modèles IP et IN, la présence et l'activation des lymphocytes T CD4 ne semblent pas crucial au contrôle de l'infection comme le montre le faible impact de la déficience en MHC-II. Une augmentation très importante des titres bactériens dans les souris déficientes pour CD3 suggère cependant un rôle majeur des lymphocytes T dans le contrôle de l'infection.

La peau contient plusieurs populations très spécialisées de lymphocytes tels que des cellules T  $\gamma\delta$ . Ces cellules pourraient, en collaboration avec les cellules T  $\alpha\beta$  CD4 ou CD8 recrutées pendant l'infection, jouer un rôle important. Une meilleure caractérisation des lymphocytes produisant de l'IFN- $\gamma$  et l'identification des signaux impliqués dans leur activation, nous permettrait de mieux comprendre la régulation de l'activité des monocytes.

## Perspectives

De nombreuses données ont pu être confirmées ou confortées grâce à l'étude de l'infection intradermale. Cependant, d'autres analyses sont nécessaires afin d'approfondir les connaissances de cette infection.

Notre étude préliminaire suggère que les neutrophiles, premières cellules recrutées au niveau du site d'infection, ne seraient pas infectées par *Brucella*. Afin d'identifier avec précision les cellules infectées, une analyse immunohistologique de la lésion incluant les marqueurs spécifiques des monocytes serait nécessaire. De plus, une analyse en microscopie confocale permettrait de déterminer si les cellules sont réellement infectées ou s'il s'agit seulement d'une superposition des marqueurs. Une quantification des cellules infectées est également nécessaire pour suivre l'évolution de la bactérie au cours du temps.

La réponse efficace contre *Brucella* est une réponse de type  $T_H1$  dans le modèle intrapéritonéal. Dans le modèle intranasal, la  $T_H1$  et la  $T_H17$  semblent tous deux impliqués dans le contrôle de l'infection. Dans notre modèle d'infection cutané, nous avons démontré que la production d'IFN- $\gamma$  est indispensable. Cependant, les souris  $CD3^{-/-}$ , qui présentent une quantité important d'IFN- $\gamma$  produit par les NK, démontrent que le contrôle de l'infection nécessite des facteurs additionnels à l'IFN- $\gamma$ . L'identification de ces facteurs constitue une perspective intéressante dans la caractérisation de notre modèle cutané.

Comme mentionné précédemment, nous avons lancé plusieurs études préliminaires pour mieux comprendre la réponse immunitaire contre *Brucella*. Les premiers résultats obtenus suggèrent l'implication de l'enzyme iNOS, productrice de NO, dans le contrôle de l'infection. De même, la structure des organes lymphoïdes secondaires (ganglions et rate) semblent avoir un impact sur l'évolution de la réponse immunitaire. Finalement, les lymphocytes B et surtout le rôle de la réponse immunitaire mémoire devront également être étudié. L'ensemble de ces éléments sont des perspectives d'études importantes à la suite de ce mémoire.

De façon générale, le modèle d'infection au niveau de la patte est la première partie de l'étude intradermale. L'idéal serait de mettre au point un modèle d'infection au niveau de l'oreille. Le but serait d'induire une légère blessure dans la peau de l'oreille externe, et d'y déposer une « goutte » contenant *Brucella melitensis*. En plus de pouvoir réaliser les expériences menées en patte, ce modèle présente de nombreux avantages. Tout d'abord, ce mode d'infection est plus physiologique. En effet, le fait de déposer une goutte sur une lésion cutanée permettrait de comprendre comment *Brucella* dissémine et entre dans l'organe. Ensuite, comme la peau de l'oreille externe est très fine, en la plaçant sous un microscope, nous pourrions suivre en temps réel l'évolution de la bactérie (multiplication et infection des cellules) et les recrutements cellulaires locaux. De plus, ce modèle est avantageux au niveau éthique dans le sens où la peau externe de l'oreille peut être étudiée sans désagrément pour l'animal et il ne sera plus nécessaire d'euthanasier les animaux. Ce modèle d'infection en oreille présente donc de multiples attraits.



## **Matériel & Méthodes**

---

## Materiel

### 1. Souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée est *Brucella melitensis* 16M. Il s'agit d'une souche lisse, résistante à l'acide nalidixique (Nal<sup>R</sup>). Dans notre cas, elle a été modifiée pour exprimer la protéine fluorescente (mCherry) de manière constitutive (Copin *et al.*, 2012). La souche est également résistante à la kanamycine (Kan<sup>R</sup>).

### 2. Souris

Les souris utilisées au cours de ce mémoire sont les C57BL/6 sauvages et déficientes pour les gènes CCR2<sup>-/-</sup>, IFN $\gamma$ -R<sup>-/-</sup>, TAP1<sup>-/-</sup>, MHCII<sup>-/-</sup>, CD3<sup>-/-</sup>, MuMT<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup> et LT $\beta$ <sup>-/-</sup> sur fond génétique de C57BL/6. Les souris utilisées dans cette étude proviennent de l'animalerie de l'ULB (Université Libre de Bruxelles, Belgium). L'élevage des souris est conforme aux règles éthiques de l'ULB. Leur manipulation ainsi que les procédures de manipulation sont conformes aux législations européennes actuelles (directive 86/609/EEC) et à la loi belge (Décret royal de la protection des animaux de laboratoire, publiée le 14 mai 2010). Au moment de l'infection, les souris étaient âgées de 8 à 12 semaines. Afin d'obtenir des statistiques correctes, minimum 5 souris sont utilisées dans chaque groupe de tests. Le protocole complet a été révisé et approuvé par le comité de bien-être des animaux de l'université de Namur.

### 3. Milieux

#### Milieu de culture riche pour *Brucella* : Le 2 YT agar

Le 2 YT agar est un milieu de culture riche pour *Brucella*. Il est préparé à partir d'un stock contenant 20g/l de Mix LB liquide, 5g/l de yeast extract, 6g/l de peptone et 1g/l d'agar. L'agar est ajouté uniquement pour les préparations de milieux solides. Pour préparer le milieu nécessaire, il faut mélanger 44g/l de la préparation stock dans de l'eau bi-distillée et ensuite l'autoclaver.

#### PBS 10x

Le tampon phosphate salin (*Phosphate buffered saline*) est composé de 80g/l de NaCl, 2g/l de KCl, 11,5 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 2,4 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à préparer dans de l'eau bi-distillée. Cette solution doit être mise à pH entre 7 et 7,4. Avant utilisation, elle doit être diluée 10x dans de l'eau bi-distillée.

#### FACS Buffer

La préparation du FACS Buffer se fait dans 500 ml de PBS 1x auquel il faut ajouter 0,5% de BSA (bovin serum albumine) et 0,02% de NaN<sub>3</sub>. Une agitation de 30 minutes permet la dissolution complète.



### Milieu de culture complet pour cellules eucaryotes

Ce milieu de culture riche est réalisé sur base de 500ml de RPMI 1640, auquel il faut ajouter 50ml de FBS décomplémenté<sup>8</sup> 10x, 5ml de L-Glutamine (100x), 5ml d'acides aminés non-essentiels (100x), 5 ml de pyruvate sodium (100x) et 500 µl de Gentamycin (50mg/ml).

Réactifs	Références	Fournisseur
FBS	10270-106	Invitrogen
L-Glutamine	25030-024	Life technologies
Acides aminés non-essentiels	11140-035	Life technologies
Sodium Pyruvate	11360-039	Life technologies

### PBS-triton pour lyser les cellules

Le PBS-triton est utilisé pour lyser les cellules afin de libérer leur contenu ainsi que les bactéries intracellulaires, notamment lors de l'évaluation du titre bactérien. Dans la préparation de cette solution, 500µl de Triton x-100 sont ajoutés à 500ml de PBS 1x. Ce milieu doit également être autoclavé.

### Solution de blocking

La solution de blocking permet de bloquer les sites aspécifiques lors des colorations en histologie. Pour la préparer, il suffit d'ajouter 0,5g de blockink reagent dans 50 ml de PBS 1x sous agitation. Pour faciliter la dissolution du composé, la solution peut être chauffée. La solution est mise à pH entre 7 et 7,4.

### Paraformaldéhyde (PFA) (4%)

La solution est préparée en ajoutant 4 g de paraformaldéhyde (PFA) à 50 ml d'H<sub>2</sub>O bi-distillée sous agitation. Cette opération doit se faire sous hotte chimique car le PFA est toxique. Cette solution est chauffée à 70°C maximum. La solution ne peut par contre pas bouillir. Lorsque la température est atteinte, quelques gouttes de NaOH (1M) sont ajoutées pour favoriser la dissolution du composé. La solution est refroidie sur glace, toujours sous la hotte chimique, puis 10 ml de PBS 10x sont ajoutés. Il faut ensuite mettre la solution à pH entre 7 et 7,4. Pour terminer, il suffit de mettre la solution à volume avec de l'eau bi-distillée (volume final étant de 100 ml). La solution est filtrée (0,22 µm) avant d'être aliquotée en Falcon 15 ml. Ceux-ci sont conservés à - 20°C. En fonction des utilisations, les concentrations du PFA varient. Le PFA s'utilise, par exemple, à 1% pour fixer les cellules à l'analyse cytométrique et à 2% pour fixer les organes en histologie avant la congélation.

### Collagénase D

La collagénase D se trouve sous forme de poudre, il faut la resuspendre dans du RPMI. Le volume à ajouter est calculé en fonction de l'activité enzymatique de l'enzyme (à voir sur le récipient). La solution est filtrée avant d'être aliquotée en épendorfs de 1ml et conservée à - 20°C.

<sup>8</sup> Afin de détruire le complément, il suffit de déposer le FBS dans un bain à 56°C pendant 30 minutes.

$$(\text{Act.} \times 750\text{ml} \times 500\text{mg}) / 4000 \text{ mg} = \text{volume (ml)}$$

## Dnase I

La DNase I est sous forme de poudre, il faut la resuspendre dans du NaCl (0,15M) afin d'avoir une solution finale de 10mg/ml. Après avoir aliquoté la DNase en épendorfs de 1ml, elle peut être conservée à moins 20°C.

## Origines des réactifs

Produit	Utilisation	Références	Fournisseur
Mix LB liquide	Milieu de culture constitué d'hydrolysate de caséine (10 g/l) , de NaCl (5 g/l) et de Yeast extract (5 g/l)	22700-041	Luria Bertani
Dnase I	Dégradation de l'ADN	11284932001	Roche Applied Sciences
Collagenase	Dégradation du collagène	11088866001	Roche Applied Sciences
2.4G2	Récepteur Fc de rat anti-souris	553142	BD Pharmingen
Permash (saponin-based buffer)	Perméabiliser les membranes cellulaires	51-2091KZ	BD Pharmingen
GolgiStop	Arrêter le trafic intracellulaire	51-209K2	BD Biosciences
RPMI 1640	Milieu	52400-025	Life Technologies Laboratories
Tissue-Tek OCT	« optimal cutting temperature » Milieu de congélation	1119300006	Sakura
Blocking reagent	Bloquer les sites aspécifiques lors de colorations	11096176001	Boehringer
Fluoro-Gel medium	Milieu de montage	1785-10	Electron microscopy Sciences
Triton X-100	Lyser les cellules	UN3082	Sigma-Aldrich



## Méthodes

### 1. Réveil de la souche bactérienne

La souche bactérienne *Brucella melitensis* est stockée à -80°C. Une semaine avant l'infection des souris, la souche bactérienne est mise en croissance. A l'aide d'un enseigneur, un isolat du stock est prélevé et étalé sur boîte de 2YT agar contenant de la kanamycine. La boîte est placée dans l'incubateur à 37°C.

### 2. Mise en culture liquide

La veille de la préparation de la dose infectante et donc de l'infection des souris, la souche bactérienne est mise en culture liquide. Quelques colonies sont prélevées à partir de la boîte de Petri de mise en croissance (réalisée une semaine plus tôt). Celles-ci sont mises en culture dans 10 ml de 2YT liquide. Cette culture liquide est alors incubée à 37°C avec agitation pour une durée de 15 heures.

### 3. Préparation de la dose infectante

Le jour de l'infection, la dose infectante est préparée. Pour cela, la densité optique (D.O.) de la suspension bactérienne est déterminée à 600nm pour en évaluer la quantité bactérienne. Une densité optique de 1 équivaldrait à  $3 \times 10^9$  bactéries par ml. Après deux lavages au RPMI, la D.O. est réévaluée et les facteurs de dilutions calculés afin d'obtenir la dose infectante souhaitée. Grâce à ce facteur de dilution, la quantité de suspension bactérienne à ajouter au RPMI est calculée en fonction de l'équation suivante :

$$(D.O \times 3.10^9) / \text{dose souhaitée} = \text{facteur de dilution}$$

$$V_{\text{total}} / \text{facteur de dilution} = V_{\text{bactérien}}$$

$$V_{\text{total}} = V_{\text{bactérien}} + V_{\text{RPMI}}$$

La dose infectante préparée dans le cadre de cette étude est de  $2 \times 10^6$  CFU/ml. En dernier lieu, la dose infectante est vérifiée en réalisant des dilutions sériées qui seront étalées sur boîte de 2YT agar avec kanamycine.

### 4. Infection des souris

Au moment de l'infection, les souris sont âgées de 8 à 12 semaines. L'infection est réalisée par voie intradermale au niveau du coussinet plantaire. Environ 10 µl de la solution bactérienne sont injectés. Les animaux contrôlés ont été injectés avec le même volume en RPMI seul.

## Tableaux prenant les différentes dilutions pour l'évaluation du titre bactérien

A 3 jours post-infection

Souris B6	Lésion	Ganglion	Rate
WT	-2,-3	0,-1	0,-1
CCR2	-2,-3	0,-1	0,-1
IFN $\gamma$ R	-2,-3	-1,-2	-1,-2
TAP1	-1,-2	0,-1	0,-1
MHCII	-1,-2	0,-1	0,-1
CD3	-2,-3	0,-1	0,-1

A 7 jours post-infection

Souris B6	Lésion	Ganglion	Rate
WT	-2,-3	-1,-2	-1,-2
CCR2	-2,-3	-1,-2	-1,-2
IFN $\gamma$ R	-4,-5	-2,-3	-2,-3
TAP1	-1,-2	-1,-2	-1,-2
MHCII	-1,-2	-1,-2	-1,-2
CD3	-2,-3	-1,-2	-1,-2

A 14 jours post-infection

Souris B6	Lésion	Ganglion	Rate
WT	-1, -2	-1,-2	-1,-2
CCR2	-1,-2	-1,-2	-1,-2
IFN $\gamma$ R	-3,-4	-2,-3	-2,-3
TAP1	-1,-2	-1,-2	-1,-2
MHCII	-1,-2	-1,-2	-1,-2
CD3	-2,-3	-1,-2	-1,-2
MuMT	0,-1	0,-1	0,-1
iNOS	-2, -3	-2, -3	-2, -3
LTb	-1, -2	-1, -2	-1, -2

A 28 jours post-infection

Souris B6	Lésion	Ganglion	Rate
WT	0	0	0
CCR2	0	0	0
TAP1	0	0	0
MHCII	0	0	0
CD3	-1,-2	-1,-2	-1,-2
MuMT	0	0	0
iNOS	-1.-2	-1.-2	-1.-2
LTb	0	0	0

A 50 jours post-infection

Souris B6	Lésion	Ganglion	Rate
WT	0	0	0
CCR2	0	0	0
TAP1	0	0	0
MHCII	0	0	0
CD3	-1,-2	-1,-2	-1,-2
MuMT	0	0	0



## 5. Euthanasie et dissection des souris

Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale aux temps post-infection voulus. Après euthanasie, les souris sont inhibées d'alcool à 70%. Les organes prélevés sont les lésions, les ganglions lymphatiques associés et la rate.

Pour étudier la lésion, le coussinet plantaire est prélevé. Ceci est fait en insérant la lame du scalpel à la base de la patte, en remontant vers les doigts de la patte. Le ganglion drainant directement la lésion est le ganglion poplitée. Il se situe à l'arrière des membres inférieurs, dans le fossé poplitée. Le ganglion se situe à l'intersection des muscles semi-membraneux, biceps fémoral et gastrocnémien. Après avoir écarté la peau, il est simplement prélevé à l'aide d'une pince. Pour prélever la rate, l'animal est couché sur son flanc droit (la rate se trouvant à gauche). Après avoir coupé la peau et le péritoine aux ciseaux, la rate est prélevée en la pincant légèrement pour ne pas l'endommager.

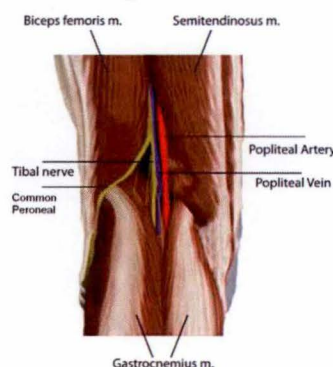


Figure 4 – Anatomie du fossé poplitée gauche (*Basem B Morcos et al., 2011*)

Les organes sont étudiés de différentes fonctions (évaluation du titre bactérien, cytométrie de flux, microscopie à fluorescence) comme décrites ci-dessous.

## 6. Evaluation du titre bactérien dans les organes prélevés

Le comptage des CFU (colony forming units) permet de déterminer le nombre de bactéries capables de reformer une nouvelle colonie dans chaque organe à différents temps post-infectieux. L'organe prélevé est déposé dans un sachet stérile et écrasé au travers de celui-ci. L'organe écrasé est ensuite resuspendu dans une solution de PBS/0,1% Triton X-100 et transféré dans un Falcon 15ml. Des dilutions sériées sont ensuite réalisées pour obtenir le nombre de bactéries le plus précis possible et étalées sur un milieu 2YT contenant de la kanamycine. Les boîtes doivent incuber à 37°C entre 3 à 7 jours pour pouvoir compter les colonnies.

Ci-contre se trouvent les tableaux des dilutions préconisées pour l'étalement sur boîtes, en fonction des jours post-infection, des organes et des souris.

## 7. Cytométrie de flux

La cytométrie de flux permet de caractériser les cellules et dans notre cas, de phénotyper les cellules recrutées dans les organes au courant de l'infection. Les cellules passeront une par une devant un faisceau de lumière monochromatique et les différents détecteurs nous renseignent sur les caractéristiques des cellules. Le « side scatter » est un détecteur perpendiculaire qui permet d'obtenir les caractéristiques de granulosité. Le « forward scatter » se situe dans l'axe des faisceaux et permet de donner les caractéristiques sur la taille de la cellule. D'autres détecteurs permettent de caractériser la fluorescence des cellules mesurant celles-ci à des longueurs d'onde de 530, 585, 661 et 670 nm. Les cellules sont sélectionnées selon la taille et la granulosité de manière à éliminer les cellules mortes et les débris de l'analyse. Les cellules autofluorescentes sont également écartées de l'analyse. Pour phénotyper les cellules, les anticorps sont couplés aux fluorochromes fluorescéine (FITC), phycoérythrine (PE) ou allophycocyanine (APC).

En pratique, les organes prélevés sont cisailés dans des plaques 6 puits avec un ou deux gouttes de collagénase-DNase (1ml de collagénase et 100  $\mu$ l de DNase à ajouter dans 10ml de RPMI), puis sont incubés dans la collagénase-DNase durant 30 minutes à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après avoir rajouté 8 à 10 ml de RPMI froid par puits pour arrêter l'action des enzymes, les cellules sont transférées dans des Falcons 15ml en les filtrant avec un voile de mariée (72 $\mu$ m). Les Falcons sont ensuite centrifugés à 1400 révolution par minutes (rpm) pendant 7 minutes afin de culotter les cellules. Après avoir resuspendu ces cellules dans 5ml/Falcon de milieu de culture riche avec du GolgiStop (1 $\mu$ l/ml), elles incubent entre 3 et 4h à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Cette étape est nécessaire lors d'un marquage intracellulaire. En effet, le GolgiStop va, comme son nom l'indique, bloquer les vésicules de Golgi du cycle intracellulaire sans les détruire. Ceci permettra de quantifier la production de certaines cytokines comme l'IFN $\gamma$ . Il est important de ne pas visser les Falcons à fond pour laisser « respirer » les cellules. Après cette incubation, les cellules sont à nouveau centrifugées à 1400 rpm pendant 7 minutes à 4°C. Les culots sont resuspendus dans 1ml de milieu de culture complet, avant incubation au frigo durant la nuit.

Le lendemain matin, une centrifugation à 1400 rpm pendant 7 minutes permet de culotter les cellules, le surnageant est retiré en retournant les Falcons au dessus d'une poubelle liquide, et le culot est resuspendu dans du tampon FACS (200  $\mu$ L à 1mL) puis mis en plaque 96 puits. Cette plaque est centrifugée à 2000 rpm durant 2 minutes, le surnageant est aspiré à la pompe et les cellules culottées sont resuspendues dans 140  $\mu$ l de tampon de FACS avec du 2.4.G2 (1/200) pour une incubation de 20 minutes au frigo. Le 2.4.G2 est un anticorps anti-récepteur Fc de rat anti-souris qui permet de bloquer les sites aspécifiques. Après une nouvelle centrifugation de 2 minutes à 2000 rpm, le culot est resuspendu dans le mélange d'anticorps de surface réalisé dans du tampon de FACS froid (150  $\mu$ l). Les cellules doivent ensuite incuber au frigo pendant 30 minutes afin de permettre aux anticorps de se fixer à leurs antigènes. Des lavages sont ensuite effectués dans le but d'éliminer l'excès d'anticorps. Ces lavages consistent à centrifuger la plaque à 2000 rpm pendant 2 minutes puis à remettre du tampon de FACS froid. Cette étape est répétée trois fois.

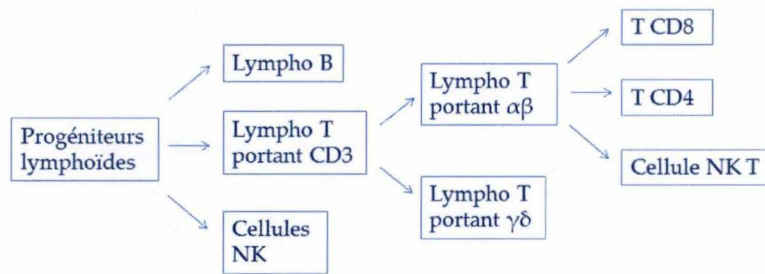


Les culots lavés sont alors resuspendus dans 150 µl de PAF 1% (5ml PAF 4% + 15ml FACS buffer) et mis au frigo pour une incubation de 15 minutes. Cette étape permet de fixer les bactéries. Trois lavages sont effectués avant de resuspendre les cellules dans 150 µl du mélange d'anticorps intracellulaires réalisé dans un tampon de FACS et 10% de permwash. Le permwash permet de perméabiliser les membranes cellulaires pour permettre à l'anticorps intracellulaire d'entrer dans la cellule. Une nouvelle incubation de 30 minutes au frigo permet donc aux anticorps de se lier. Une dernière étape de lavage est nécessaire pour éliminer les excès d'anticorps, avant de resuspendre les cellules dans 150 µl de tampon FACS et finalement de les transférer dans des tubes spécifiques au FACS contenant déjà 400 µl de PAF 1%. Il ne reste alors plus qu'à passer les tubes au cytomètre de flux. Le cytomètre utilisé est le FACS Calibur cytofluorometer (BD Biosciences).

Les anticorps utilisées au cours des manipulations sont les suivants:

Canal	Anticorps	Dilution	Clone	Référence	Fournisseur
Fluoresceine (FITC)	CD11b	1/200	M1/70	553310	BD Pharmingen
	TCRb	1/200	H57-597	553171	BD Pharmingen
	CD3e	1/200	145-2C11	553062	BD Pharmingen
	CD90	1/200		105.317	Bio Legend
Phycoerythrin (PE)	CD4	1/200	RM4-5	553049	BD Pharmigen
	CD8a	1/200	53-6.7	553033	BD Biosciences
	Nk1.1	1/200	PK136	553165	BD Biosciences
	Ly6G	1/400	1A8	551461	BD Pharmigen
	gd TCR	1/200	GL3	553178	BD Pharmigen
Allophycocyanin (APC)	CD4	1/400	RM4-5	553051	BD Biosciences
	IFN-γ	1/300	XMG1.2	554413	BD Parmigen
	F4/80	1/200	BM8	17.4801.82	BD Biosciences
	MHCII	1/200	M5/114.15.32	17.5321.81	eBioscience

Afin de phénotyper au mieux les sous-populations recrutées durant l'infection, nous avons défini plusieurs critères à remplir pour confirmer la nature des cellules. Par exemple, les cellules positives pour CD11b sont considérées comme des cellules myéloïdes. Les cellules positives pour TCR ou CD3 sont des lymphocytes.



Les cellules positives pour CD3 peuvent être des lymphocytes  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ . Parmi les  $\alpha\beta$ , on retrouve aussi les sous-populations CD8, CD4 ou des NK T. Les cellules NK T sont non seulement positives pour CD3 mais aussi pour l'anticorps NK1.1. Les cellules négatives pour CD3 sont probablement des cellules NK. Ceci est confirmé par un anticorps NK1.1. Entre autre, les cellules NK semblent également être positives pour l'anticorps CD90.2 (non-illustré).



Dans la lésion, le phénoype des cellules recrutées suite à l'infection :

Phénotype	Types cellulaires
CD11b <sup>+</sup>	Cellules myéloïdes
CD11b <sup>+</sup> Ly6G <sup>+</sup> F4/80 <sup>-</sup>	Neutrophiles
CD11b <sup>+</sup> Ly6G <sup>-</sup> F4/80 <sup>+</sup>	Monocytes
TCR <sup>+</sup>	Lymphocytes
TCR <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	Lymphocytes T CD8
TCR <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup>	Lymphocytes T CD4

Dans le ganglion, les cellules positives pour IFN- $\gamma$  en APC sont les cellules productrices de l'IFN- $\gamma$ . Nous essayons également de phénotyper ces producteurs dans les ganglions lymphatiques.

Phénotype	Types cellulaires
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	T CD4 produisant IFN- $\gamma$
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	T CD8 produisant IFN- $\gamma$
TCR <sup>+</sup> NK1.1 <sup>+</sup>	NK T produisant IFN- $\gamma$
TCR <sup>-</sup> NK1.1 <sup>+</sup>	NK produisant IFN- $\gamma$
CD90 NK	NK produisant IFN- $\gamma$

## 8. Microscopie à fluorescence

Les organes prélevés sont fixés dans le PFA 2% pour une durée de 4h à température ambiante. Après deux lavages au PBS 1x, ils sont incubés dans une solution de PBS-sucrose à 20% pour la nuit, à 4°C. Le lendemain, les organes sont plongés dans des cupules de Tissue-Tek OCT (Sakura) et gelés à l'azote liquide. Des sections de 5  $\mu$ m sont réalisées à l'aide du cryostat et placées sur des lames superfrost. Les coupes sont conservées à -20°C.

Pour les colorations, les coupes gelées sont d'abord réhydratées dans du PBS 1x pendant quelques minutes. Ensuite, une piscine est réalisée sur les lames en essuyant les bords de la lame avec un papier. Du blocking reagent (PBS-BR 1%, Boeringer) est déposé sur les lames et incubé durant 20 minutes. Les lames sont lavées en les agitant dans 3 bains de PBS 1x. A nouveau, des piscines sont réalisées sur chaque lame. Le mélange d'anticorps est réalisé dans la solution de blocking. Chaque lame est ensuite incubée avec cette combinaison d'anticorps durant la nuit. Le lendemain, les lames sont lavées et fixées à l'aide du milieu de montage Fluoro-Gel.

L'observation des lames est optimale 3 ou 4 jours après la coloration. L'observation se fait grâce à un microscope inversé utilisant la fluorescence (Axiovert 200, Zeiss) équipé d'une caméra monochrome à haute résolution (AxioCam HR, Zeiss).

Les marqueurs utilisés sont les suivants :

Anticorps et marqueurs	Canal	Dilution	Références	Fournisseur
DAPI nucleic acid stain	Alexa Fluor 355	1/1000	D9542	Sigma-Aldrich
Palloidin	Alexa Fluor 488	1/100	A12379	Invitrogen
CD11b	Alexa Fluor 647	1/200	51.0114.82	eBiosciences
MHCII	Alexa Fluor 647 (APC)	1/100	17.5321.82	eBiosciences
Gr-1 (anti Ly6G)	Alexa Fluor 647 (APC)	1/200	51.5931.82	eBiosciences
CD90	Alexa Fluor 647	1/200	105.317	BioLegend
F4/80	Alexa Fluor 647 (APC)	1/100	17.4801.82	eBiosciences

## 9. Taille des lésions et aspect

Lorsque les souris sont infectées, l'épaisseur de patte est mesurée au niveau du coussinet plantaire à différents temps post-infection à l'aide d'un vernier (figure). L'aspect des lésions est également pris en compte (gonflement important, apparition de nécrose, etc.)



Vernier permettant de mesurer l'épaisseur des pattes après infection

## 10. Analyse statistique

Le test Wilcoxon-Mann-Whitney a été utilisé pour toutes les analyses statistiques de ce mémoire. Ce programme est fourni par le programme d'analyses statistiques GraphPad Prism. Dans chaque groupe, les souris infectées ont été comparées avec le groupe de souris naïves. Chaque groupe de souris déficientes a également été comparé avec le groupe de souris sauvages correspondant. La valeur de  $p < 0,05$  est considéré comme significativement différent comparé au groupe de référence avec :  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  et  $***p < 0,001$ .

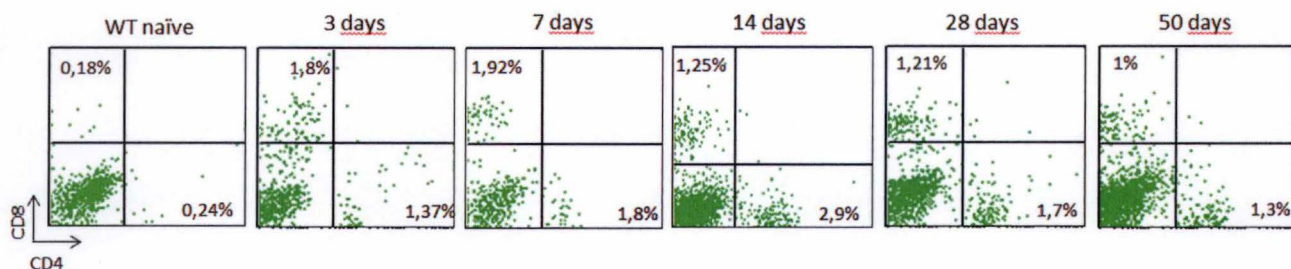


## **Annexe**

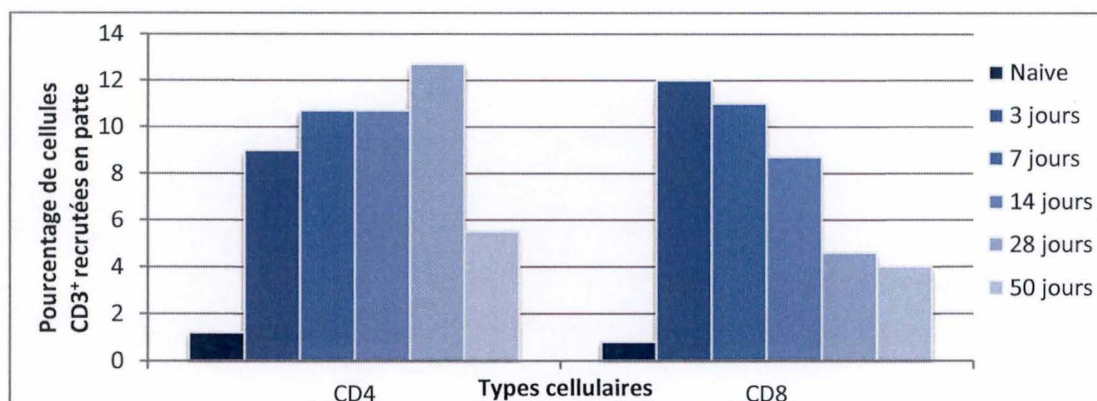
---

## Annexe

### Lymphocytes dans la patte des souris

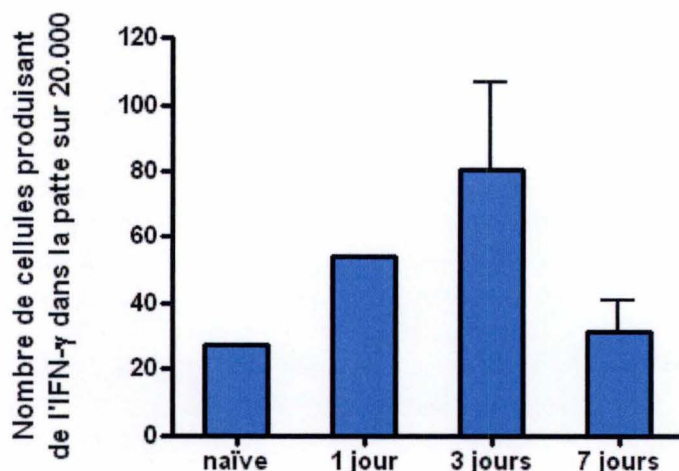


Annexe 1 – Phénotypage du recrutement de cellules lymphoïdes dans la patte des souris WT naïves et infectées à différents temps. Les cellules recrutées sont positives pour CD3 (marqueur de lymphocytes T). Le pourcentage indique le nombre de cellules CD4 ou CD8 par rapport au nombre total de cellules présentes dans la patte. On observe une faible augmentation des lymphocytes chez les souris infectées comparé aux WT. Le phénotypage de ces cellules indique un pic de CD4 à 14 jours post-infection. Pour les CD8, le pourcentage varie entre 1,8% et 1,2% tout au long de l'infection.

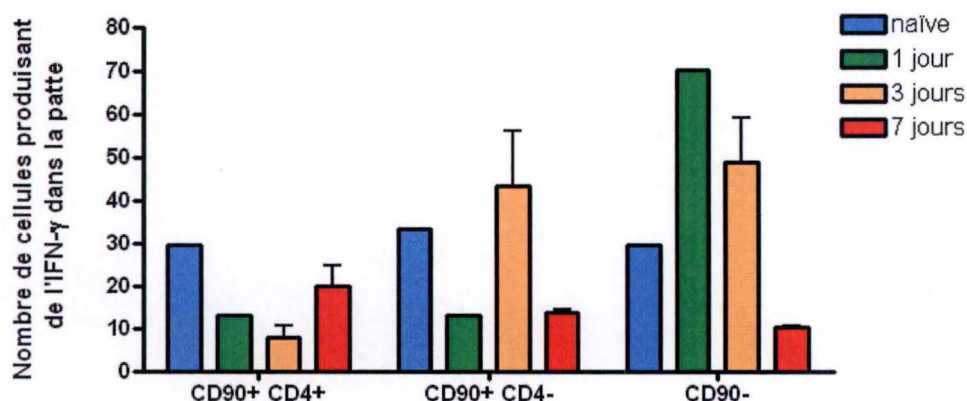


Annexe 2 – Pourcentage de cellules positives pour CD4 ou CD8 parmi les cellules lymphoïdes (CD3<sup>+</sup>) recrutées en patte.





Annexe 3 – Nombre de cellules productrices d'IFN- $\gamma$  dans la patte (sur 20.000 cellules totales). La production d'IFN- $\gamma$  est donc aussi très faible. Moins de 100 cellules sur 20.000 cellules présentes dans la patte sont productrices d'IFN- $\gamma$ .



Annexe 4 – Phénotypage des cellules parmi les productrices d'IFN- $\gamma$  dans la patte. Parmi ces cellules productrices, on retrouve des cellules positives pour CD90+ (CD4+ ou CD4-) et des cellules négatives pour CD90- (cellules non-lymphoïdes). A 1 jour post-infection, les principaux producteurs sont les CD90-. A 3 jours, ce sont les cellules CD90<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Celles-ci peuvent être des NK, des T  $\gamma\delta$ , des T CD8 ou des NKT. A 7 jours, on observe l'arrivée des T CD4 produisant l'IFN- $\gamma$ .

## **Bibliographie**

---



## Bibliographie

Abbas et Lichtman (2013) Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, 4<sup>nd</sup> édition, , 2013. Edition Elviesier Masson.

Akcali C, Savas L, Baba M, Turunc T, Seckin D. (2007) Cutaneous manifestations in brucellosis: a prospective study. *Adv Ther.* 2007;24:706–11.

Araya, L. N., P. H. Elzer, G. E. Rowe, F. M. Enright and A. J. Winter (1989). Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *J. Immunol.* 143: 3330-7.

Archambaud C, Salcedo SP, Lelouard H, Devilard E, de Bovis B, Van Rooijen N, Gorvel JP, Malissen B. (2010) Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary *Brucella* infection. *Eur J Immunol.* 2010 Dec;40(12):3458-71.

Atluri, V. L., Xavier, M. N., de Jong, M. F., den Hartigh, A. B., & Tsolis, R. M. (2011). Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annual review of microbiology*, 65, 523–41. doi:10.1146/annurev-micro-090110-102905

Baldwin, C. L., & Goenka, R. (2006). Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Critical reviews in immunology*, 26(5), 407–42.

Basem B Morcos, Sameh Hashem, Firas Al-Ahmad (2011) Popliteal lymph node dissection for metastatic squamous cell carcinoma: a case report of an uncommon procedure for an uncommon presentation. *World Journal of Surgical Oncolgy*. 15 October 2011. ID: 3206843

Bold, T. D. and J. D. Ernst (2009). Who benefits from granulomas, mycobacteria or host?. *Cell*. 136: 17-9.

Brinkmann, V. and A. Zychlinsky (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 5: 577-82.

Broxmeyer HE, Lu L, Platzer E, Feit C, Juliano L, Rubin BY. (1983) Comparative analysis of the influences of human gamma, alpha and beta interferons on human multipotential, erythroid and granulocyte-macrophage progenitor cells. *J. Immunol.* 1983 Sep; 131(3):1300-5

Chakravorty, D., and M. Hensel. 2003. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes Infect.* 5: 621–627.

Clark RA, et al. The vast majority of CLA<sup>+</sup> T cells are resident in normal skin. *J. Immunol.* 2006;176:4431–4439.

Coquerelle, C. and M. Moser (2010). DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev* 234: 317-34.

Donnelly KB, Lima HC, Titus RG. (1998) Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *J Parasitol.* 1998;84:97-103

Copin, R., Baetselier, P. De, Carlier, Y., Letesson, J., & Muraille, E. (2007). MyD88-Dependent Activation of B220 / CD11b / LY-6C / Dendritic Cells during *Brucella melitensis* Infection. *The Journal of Immunology*, 2007.

Copin, R., Vitry, M.-A., Hanot Mambres, D., Machelart, A., De Trez, C., Vanderwinden, J.-M., Magez S., Shizuo Akira, Ryffel B., Carlier Y., Letesson J.J., Muraille, E. (2012). In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. *PLoS pathogens*, 8(3), e1002575. doi:10.1371/journal.ppat.1002575

Corbel, M. J. (1997). Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 3: 213-21.

Delrue, R. M. , M. Mar t inez-Lorenzo, P. Lestrade, I. Danese, V. Bielarz, et al. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 3: 487-97.

Desjardins M. (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nature Reviews Immunology*, 3, 208-291 (April 2003)

De Trez C, Magez S, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Muraille E. (2009) iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania* major infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000494.

Djaldetti, M. , H. Salman, M. Bergman, R. Djaldetti and H. Bessler (2002). Phagocytosis-the mighty weapon of the silent warriors. *Microsc Res Tech* 57: 421-31.

Esterre P., Dedet JP., Frenoy C., Chevallier M., Grimaud JA (1992) Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis : a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 1992.

Galińska, E. M., & Zagórski, J. (2013). Brucellosis in humans--etiology, diagnostics, clinical forms. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 20(2), 233-8.

Gregoire, C., L. Chasson, C. Luci, E. Tomasello, F. Geissmann, et al. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 220: 169-82



Godfroid, J., Scholz, H. C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., Letesson, J.-J. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive veterinary medicine*, 102(2), 118–31.  
doi:10.1016/j.prevetmed.2011.04.007

Gumy A., Louis JA., Launois P (2004) The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic background. *International Journal of Parasitology* 34 (2004) 433-444

Hanot Mambres Delphine et Machelart Arnaud – non publié, soumis en 2014

He, Y. (2012). Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2(February), 2. doi:10.3389/fcimb.2012.00002

Huang, L. Y. , J. Alibert i, C. A. Leifer, D. M. Segal, A. Sher, et al. (2003). Heat-killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like receptor 2 dependent. *J Immunol* 171: 1441-6.

Huang, L. Y. , K. J. Ishii, S. Akira, J. Aliber and B. Golding (2005). Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. *J Immunol* 175: 3964-70.

Iannello, A., Debbeche, O., Samarani, S., Ahmad, A; Debbeche; Samarani; Ahmad (2008). Antiviral NK cell responses in HIV infection: I. NK cell receptor genes as determinants of HIV resistance and progression to AIDS. *Journal of Leukocyte Biology* 84: 1–26

Imhof B.A., Aurrand-Lions M. (2004) Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes, *Nature Reviews Immunology*. June 2004. doi : 10.1038/nri1375

Imhof B.A., Aurrand-Lions M, (2004) Origin and haematopoietic differentiation of myeloid antigen-presenting cells. *Nature Reviews Immunology* June 2004, 4, 432-444.

Jiang, X. , B. Leonard, R. Benson and C. L. Baldwin (1993). Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol* 151: 309- 19.

Kang SJ, Liang HE, Reizis B, Locksley RM (2008) Regulation of Hierarchical Clustering and Activation of Innate Immune Cells by Dendritic Cells. *Immunity* 29: 819–833.

Kitamura D, Roes J, Kühn R, Rajewsky K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin  $\mu$  chain gene. *Nature*. 1991;350:423–426

Kling J.C., Mack M., Korner H. (2013) The Absence of CCR7 results in dysregulated monocyte migration and immunosuppression facilitating chronic cutaneous leishmaniasis. *Plos One*. October 2013.

Ko, J. and G. A. Splitter (2003). Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 16: 65-78.

Ko, J., A. Gendron-Fitzpatrick, and G. A. Splitter. 2002. Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis. *J. Immunol.* 168: 2433-2440.

Ko, J., and G. A. Splitter. (2003) Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 65-78.

Kohler, S. , S. Michaux-Charachon, F. Por te, M. Ramuz and J. P. Liautard (2003). What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? *Trends Microbiol* 11: 215-9.

Kolaczowska E., Kubes P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. March 2013. doi 10.1038/nri3399

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517

Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. (2008) Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology.* 2008;213:183-91

Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. (2009) IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol.* 2009;182:3039-46

MacMicking, J., Q. W. Xie, and C. Nathan. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350.

MacNamara K.C., Oduro K., Martin O., Jones D.D., McLaughlin M., Kyunghee C., Borjesson D.L. Winslow G.M. (2011) Infection-induced myelopoiesis during intracellular bacterial infection is critically dependent upon IFN- $\gamma$  signaling., *The journal of immunology*, 2011, 186;1032-1043.



- Magnani D.M., Lyons E.T., Forde T.S., Shekhani M.T., Adrarichev V.A., Splitter G.A. (2013) Osteoarticular tissue infection and development of skeletal pathology in murine brucellosis. *Dis. Model Mech.*, May 2013; 6(3): 811-818
- Maroufi Y., Ghaffarifar F., Dalimi A., Sharifi Z. (2014) Interferon gamma and Interleukin-4 patterns in BALB/C mice suffering from cutaneous leishmaniasis treated with Cantharidin. *Jundishapur J. Microbiol.* Jun 2014; 7(6)10907.
- Martinez F. O.; Sica A. ; Montovani A.; Locati M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 13: 453-61.
- Martirosyan A., Moreno E., Gorvel J-P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological reviews.* 240: 211-234.
- Mills, C. D. , K. Kincaid, J. M. Al t, M. J. Heilman and A. M. Hill (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164: 6166-73.
- Muraille E., Leo O., Moser M. (2014) Th1/Th2 paradigm extended :macrophage polarization as unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Frontiers in Immunology.* 2014
- Murphy EA., Sathiyaseelan J., Michelle A, Parent, Baixiang Zou and Cynthia I. Baldwin (2001). Interferon- $\gamma$  is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology.* 103: 511-518.
- Murphy EA, Sathiyaseelan J, Parent MA, Zou BX, Baldwin CL (2001) Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology* 103: 511–518.
- Nathan, C.; M. U. Shiloh (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8841-8.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6: 173-82.
- Nestle F.O., Di Meglio P., Qin J-Z., Nickoloff B.J. (2009) *Skin immune sentinels in health and disease*, *Nature Reviews Immunology.* 2009 October; 9(10):679-691.
- Neubauer H (2010) Brucellosis: new demands in a changing world. *Sec. Med. Sci.* 2010, 209-217
- Nicholas R. J. Gascoigne (2008) Do T cells need endogenous peptides for activation? *Nature Reviews Immunology* 8, 895-900 (November 2008)

Nylen S., Eidsmo L. (2012) Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis, *Parasite Immunology*, 2012, 34, 551-561.

Nylen S., Gautam S. (2010) Immunological perspectives of Leishmaniasis. *J. Glob. Infect. Dis.* May-Aug 2010; 2(2):135-146.

Nylen S, Khamesipour A, Mohammadi A, Jafari-Shakib R, Eidsmo L, Noazin S, et al. (2006) Surrogate markers of immunity to *Leishmania major* in leishmanin skin test negative individuals from an endemic area re-visited. *Vaccine*. 2006;24:6944-54

O'Callaghan and Whatmore (2011) *Brucella* genomics as we enter the multi-genome era. *Brief Funct Genomics*. 2011 Nov;10(6):334-41.

O'Shea J.J., Pau W.E. (2010) Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4<sup>+</sup> T cells. 2010. *Sciences*. 327(5969):1098-102.

Palma GI, Saravia NG (1997). In situ characterization of the human host response to *Leishmania panamensis*. *Am J Dermatopathol*. 1997;19:585-90

Pappas, G. , P. Panagopoulou, L. Christou and N. Akritidis (2006). *Brucella* as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci*. 63: 2229-36.

Pappas G., Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. (2006) The new global map of human brucellosis. *Infection Diseases*. 2006 Feb;6(2):91-9.

Pasparakis M., Haase I., Nestle F.O. (2014) Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 11 April 2014. doi: 10.1038/nri3646

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 2008;321:970-4.

Plommet, M., & Plommet, a M. (1983). Immune serum-mediated effects on brucellosis evolution in mice. *Infection and immunity*, 41(1), 97-105.

Rajashekara G, Glover DA, Krepps M, Splitter GA (2005) Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent *Brucella melitensis* infections. *Cell Microbiol* 7: 1459-1473.

Ribeiro-Gomes, F. L., Peters, N. C., Debrabant, A., & Sacks, D. L. (2012). Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS pathogens*, 8(2), e1002536. doi:10.1371/journal.ppat.1002536

Roop RM, Bellaire BH, Valderas MW, Cardelli JA (2004). Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Mol. Microbiol*. 2004 May; 52(3):621-30. Review



Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F (2009) Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 10: 943–948.

Smelt SC, Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. (2000) B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol*. 2000;164:3681–8.

Silva Teane M. A., Erica A. Costa, Tatiana A. Paixao, Renée M. Tsois and Renato L. Santos (2011). Laboratory Animal Models for Brucellosis Research. *J. biomed. Biotech.* ID 518323.

Spink Wesley W. (1956). The Nature of Brucellosis. University of Minnesota Press, 1956 - 464 pages

Tanyel E, Tasdelen Fisgin N, Yildiz L, Leblebicioglu H, Doganci L, Tulek N (2008) Panniculitis as the initial manifestation of brucellosis : a case report. *Am. J. Dermatopathol.* 2008 Apr ; 30(2) :169-71

Toretsky JA.; Shahidi NT., Finlay JL. (1986) Effects of recombinant human interferon gamma on hematopoietic progenitor cell growth. *Exp. hematol.* 1986. Mar;14(3):182-6.

Vantourout P., Hayday A. (2013) Six-of-the-best: unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology. *Nature Reviews Immunology*. February 2013. doi 10.1038/nri33847

Vitry, M.-A., De Trez, C., Goriely, S., Dumoutier, L., Akira, S., Ryffel, B., ... Muraille, E. (2012). Crucial role of gamma interferon-producing CD4<sup>+</sup> Th1 cells but dispensable function of CD8<sup>+</sup> T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infection and immunity*, 80(12), 4271–80. doi:10.1128/IAI.00761-12

Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*. 2004;173:6521–5

Vitry MA, De Trez C, Goriely S, Dumoutier L, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Letesson JJ, Muraille E. (2012) Crucial role of gamma interferon-producing CD4<sup>+</sup> Th1 cells but dispensable function of CD8<sup>+</sup> T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect Immun*. 2012 Dec;80(12):4271-80.

Vitry MA, Hanot Mambres D, De Trez C, Akira S, Ryffel B, Letesson JJ, Muraille E. (2014) Humoral immunity and CD4<sup>+</sup> Th1 cells are both necessary for a fully protective immune response upon secondary infection with *Brucella melitensis*. *J Immunol*. 2014 Apr 15;192(8):3740-52.

Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M. & Ugolini, S.; Raulet; Moretta; Caligiuri; Zitvogel; Lanier; Yokoyama; Ugolini (2011). Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* 331 (6013): 44–49.

Wang Z-E., Reiner SL., Zheng S., Dalton DK., Locksley RM. (1994) CD4<sup>+</sup> effector cells default to the Th2 pathway in interferon  $\gamma$ -deficient mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 179, 1367-1371.

Weiss, D. S. , K. Takeda, S. Akira, A. Zychlinsky and E. Moreno (2005). MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 73: 5137-43.

Xavier MN, Winter MG, Spees AM, den Hartigh AB, Nguyen K, Roux CM, Silva TM, Atluri VL, Kerrinnes T, Kestra AM, Monack DM, Luciw PA, Eigenheer RA, Bäumlér AJ, Santos RL. (2013) PPAR $\gamma$ -mediated increase in glucose availability sustains chronic *Brucella abortus* infection in alternatively activated macrophages. *Cell host & Microbes*. 2013 Aug 14;14(2):159-70

Zeynep Karaali, Birol Baysal, Sule Poturoglu, and Mehmet Kendir. (2011) Cutaneous manifestations in brucellosis, *Indian J Dermatol*. 2011 May-Jun; 56(3): 339–340.

Zhan, Y., and C. Cheers. (1998) Control of IL-12 and IFN- $\gamma$  production in response to live or dead bacteria by TNF and other factors. *J. Immunol*. 161:1447–1453.

J. JONET - Secrétariat  
Dépt. BIOLOGIE F.U.M.D.P.  
Rue de Bruxelles 61  
B-5000 NAMUR (Belgique)  
Tél. +32(0)81.72.44.18  
Fax +32(0)81.72.44.20

18 DEC. 2014